UNTERSUCHUNGEN ZUR TRYPTOPHAN – BILDUNG

BEI ESCHERICHIA COLI K 12

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Biologie
der Eberhard–Karls–Universität zu Tübingen

vorgelegt von

HERMANN SAHM

aus Künzelsau

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547609_0041

UNTERSUCHUNGEN ZUR TRYPTOPHAN-BILDUNG BEI ESCHERICHIA COLI K 12

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Hermann Sahm
aus Künzelsau

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Nov. 1970

D e k a n :	Professor Dr. D. Varjú
1. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Zähner
2. Berichterstatter:	Professor Dr. W. Seyffert

Druck: aku- Fotodruck, 86 Bamberg, Färbergasse 8 R

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner am Institut für Biologie, Lehrbereich Mikrobiologie, der Universität Tübingen ausgeführt. Für die Überlassung des Themas, die vielen wertvollen Anregungen, das stete große Interesse und die großzügige Förderung möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Zähner herzlich danken.

Weiterhin gilt mein Dank all denen, die mir durch ihre Unterstützung sehr geholfen haben: Herrn Doz. Dr. Dütting, Max-Planck-Institut, Tübingen; Herrn Prof. Dr. U. Henning, Max-Planck-Institut, Tübingen; Herrn Prof. Dr. F. Lingens, Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Hohenheim; Herrn Dr. O. Oltmanns, Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Hohenheim; Herrn Prof. Dr. W. Vielmetter, Institut für Genetik, Köln; sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Biologie, Lehrbereich Mikrobiologie. Herrn K. Wusch möchte ich für seine Mühe beim Umzeichnen der Abbildungen danken.

In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Abkürzungen benutzt:

p-FPhe	DL-p-Fluorphenylalanin
5-FT	DL-5-Fluortryptophan
6-FT	DL-6-Fluortryptophan
5-MT	DL-5-Methyltryptophan
6-MT	DL-6-Methyltryptophan
7-MT	DL-7-Methyltryptophan
ß-Th	DL-ß-Thienylalanin
Ala	L-Alanin
Asp	L-Asparaginsäure
Cys	L-Cystein
Glu	L-Glutaminsäure
$GluNH_2$	L-Glutamin
Gly	Glycin
His	L-Histidin
Ile	L-Isoleucin
Leu	L-Leucin
Lys	L-Lysin
Met	L-Methionin
Phe	L-Phenylalanin
Pro	L-Prolin
Ser	L-Serin
Thr	L-Threonin
Try	L-Tryptophan
Tyr	L-Tyrosin
Val	L-Valin
Anth	Anthranilsäure
CdRP	1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxyribulose-5-phosphat
CS	Chorisminsäure
DAHP	3-Desoxy-D-arabino-heptulonsäure-7-phosphat
InGP	Indol-3-glycerol-phosphat
5-M-Anth	5-Methylanthranilsäure
PRA	N-5-phophoribosyl-anthranilsäure
PRPP	5-Phophoribosyl-1-pyrophosphat

Anth-synthetase (ASase)	Anthranilat-synthetase
ASase Co II	Phosphoribosylanthranilat-transferase
DAHP-synthetase	Phospho-2-keto-3-desoxy-heptonat-aldolase (EC 4.1.2.15)
InGP-synthetase (InGPase)	Indol-3-glycerol-phosphat-synthetase
Try-synthetase (TSase)	Tryptophan-synthetase (EC 4.2.1.20)
Try-ase	Tryptophanase (EC 4.2.1.e)
B_1	Thiamin
Col B	colizinogener Faktor B
Col V	colizinogener Faktor V
Gal	Galaktose
Lac	Lactose
λ^r	Resistenz gegen Phagen λ
S^r	Resistenz gegen Streptomycin
T_1^r	Resistenz gegen Phagen T_1
T_6^r	Resistenz gegen Phagen T_6
Ton B	Gen für Resistenz gegen die Phagen T_1 und ɸ 80 und die colizinogenen Faktoren B I V
Try S	Strukturgen für die Tryptophanyl-t-RNS-synthetase
Try R	Strukturgen für den Try-Aporepressor
Xyl	Xylose
MNG	N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin
RNS	Ribonukleinsäure

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	6
1. Organismen	6
2. Chemikalien	7
3. Nährmedien und Kulturbedingungen	9
4. Quantitative Bestimmung des Tryptophans	10
5. Quantitative Anthranilsäure-Bestimmung	11
6. Quantitative Indol-Bestimmung	12
7. Antagonismus-Teste	12
8. Mutantengewinnung	13
9. Sexduktion	15
10. Tests auf F-Faktor	16
11. Test auf Derepression der Tryptophan-Biosynthese-Enzyme	17
12. Bestimmung der Tryptophanase-Aktivität	18
III. Ergebnisse	20
1. Isolierung von Mutanten, bei denen die Regulationsmechanismen der Tryptophan-Biosynthese defekt sind	20
2. Isolierung von Mutanten, die resistent sind gegen einige Phenylalanin- und Tyrosin-Antimetaboliten	23
3. Untersuchung einiger auxotropher Mutanten auf Try-Ausscheidung	25
4. Beseitigung des Try-Abbaus	29
5. Veränderung der Zellpermeabilität	34
6. Isolierung Threonin- und Leucin-prototropher Mutanten	36
7. Versuche zur Partialsynthese von Try aus Indol	38
8. Try-Produktion aus Anthranilsäure	53
IV. Diskussion	69
V. Zusammenfassung	79
VI. Literaturverzeichnis	81

I. Einleitung

Im Laufe der Evolution haben sich in den Organismen Mechanismen entwickelt, die im Sinne einer ökonomischen Ordnung die Produktion und Ausscheidung von Zellbestandteilen kontrollieren. So ermöglicht es die Permeabilitätsbarriere der Zelle, Substanzen im Innern anzuhäufen, die lebensnotwendig sind, und die Stoffwechsel-Kontrollmechanismen verhindern eine Überproduktion von Biosyntheseprodukten. Das Endprodukt einer Biosynthesekette kontrolliert nach heutigem Wissen (HAYES, 1968; SCHLEGEL, 1969) mit Hilfe zweier grundsätzlich verschiedener Mechanismen den Ablauf seiner Biosynthese; es kann einerseits die Synthese der Enzyme regulieren (Repression) und andererseits die Enzymaktivität beeinflussen (Feedback-Hemmung).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die regulierenden Faktoren der Tryptophansynthese in Escherichia coli K 12 ausgeschaltet werden können. Als Versuchsorganismus wurde E. coli K 12 gewählt, da dieses Bakterium biochemisch und genetisch sehr gut untersucht ist. So ist die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren und ihre Regulation in diesem Organismus weitgehend aufgeklärt (BROWN, 1968; GIBSON und PITTARD, 1968), was eine wichtige Voraussetzung für diese Untersuchungen war. Wie aus dem Regulationsschema der Biosynthese aromatischer Aminosäuren in E. coli K 12 (Abb. 1) zu ersehen ist, treten hier mannigfache Regelvorgänge auf. Im Hinblick auf die Biosynthese des Tryptophans sind folgende Regulationsschritte von besonderer Bedeutung:

1.) Drei getrennt regulierte DAHP-synthetase-Isoenzyme katalysieren den ersten Reaktionsschritt der Aromatenbiosynthese, die Synthese von DAHP. Jedes dieser drei Isoenzyme wird spezifisch durch eine der drei aromatischen Aminosäuren reprimiert und gehemmt (DOY, 1968; PITTARD et al., 1969).

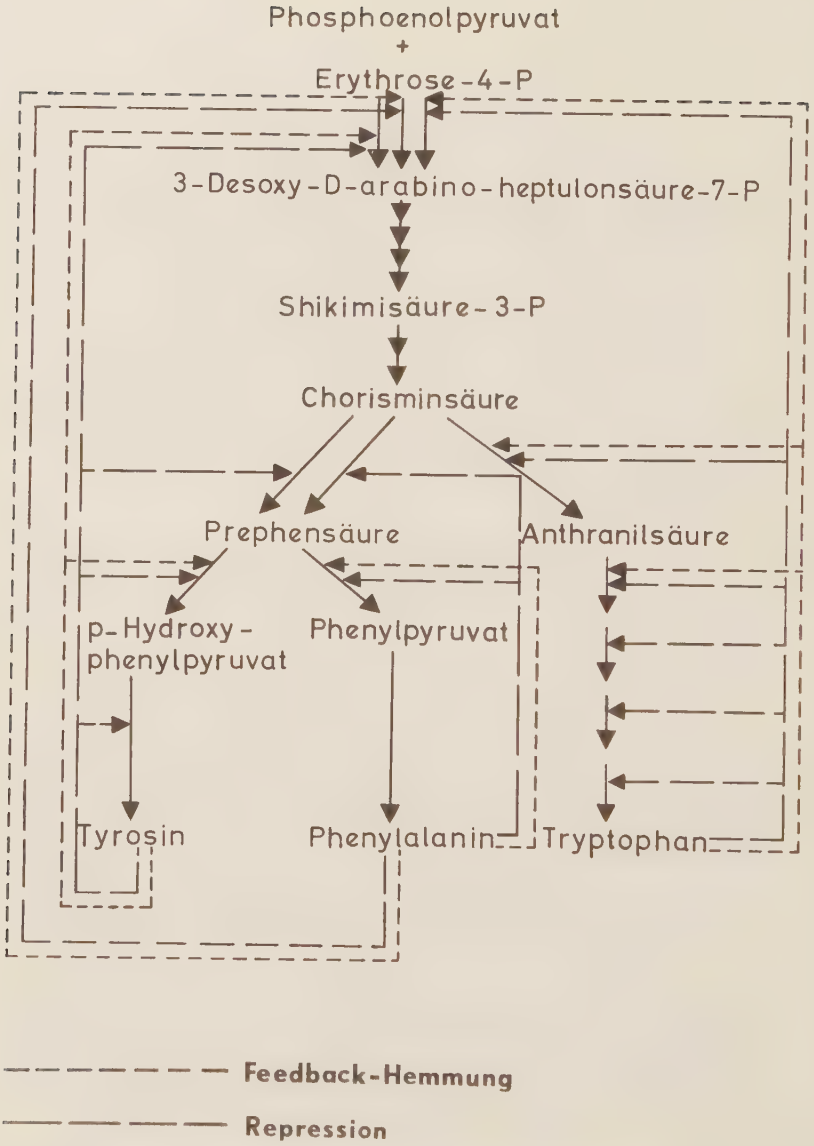

Abb. 1: Regulationsschema der Biosynthese aromatischer Aminosäuren in Escherichia coli K 12

2.) Die Gene für die Enzyme des Tryptophan-Biosynthesezweiges bilden ein Operon (IMAMOTO, 1968), die Enzyme werden deshalb in ihrer Gesamtheit durch das Endprodukt Tryptophan reprimiert (ITO und CRAWFORD, 1965; ITO und IMAMOTO, 1968).

3.) Die ersten beiden Enzyme der Tryptophan-Biosynthese, die Anthranilat-synthetase und die Phosphoribosylanthranilat-transferase, werden durch Tryptophan in ihrer Aktivität gehemmt (ITO und CRAWFORD, 1965; ITO und YANOFSKY, 1969).

Die Tryptophansynthese wird durch dieses Netz von Regulationsmechanismen auf einem für die Zelle optimalen Niveau gehalten. Diese müssen ausgeschaltet werden, um eine Überproduktion und Ausscheidung von Tryptophan zu ermöglichen, ohne dabei aber die Ausgewogenheit des Stoffwechsels in der Zelle zu sehr zu stören. Bei der mikrobiellen Aminosäurefermentation werden die intrazellulären Regulationsmechanismen der Produzentenstämme folgendermaßen umgangen (DEMAIN, 1966):

1.) Durch Mutationen in den Regulationsmechanismen

Es werden Mutanten isoliert, bei denen die Regulationsmechanismen der entsprechenden Biosynthese defekt sind. Eine Selektionsmethode für solche Stämme besteht darin, daß man Organismen isoliert, die in Gegenwart bestimmter Antimetaboliten wachsen können (ADELBERG, 1958). So scheiden Mutanten von E. coli, die gegen den Threonin-Antimetaboliten α-Amino-ß-hydroxyvaleriansäure resistent sind, bis zu 1,9 g/l Threonin ins Kulturmedium aus (SHIIO und NAKAMORI, 1969).

2.) Durch Erhöhung der Konzentration eines Intermediärprodukts

Mutanten, die ein defektes Enzym in einem Endzweig einer verzweigten Biosynthesekette haben, scheiden häufig ein anderes Endprodukt dieser Biosynthese aus. Diese Endproduktausscheidung beruht darauf, daß durch die Blockierung des einen Endzweiges die steady-state-Konzentration eines Intermediärproduktes erhöht wird, was zu einer teilweisen Beseitigung der Feedback-Hemmung führt. Stämme von Micrococcus glutamicus,

die einen Defekt in der Homoserin-dehydrogenase haben, scheiden z. B. bei geringer Threoninkonzentration im Medium große Mengen Lysin aus (NAKAYAMA et al., 1961).

3.) Durch Herabsetzung der Endproduktkonzentration

Auxotrophen Mutanten wird das zum Wachstum nötige Endprodukt nur in so geringer Konzentration zugegeben, daß es den wachstumsbegrenzenden Faktor darstellt; es wirkt dann nicht regulierend auf seine Biosyntheseenzyme. Dies führt dazu, daß das Stoffwechsel-Zwischenprodukt der Biosynthesekette, das vor dem genetischen Block auftritt, in großer Menge gebildet und angehäuft wird. Ein Beispiel hierfür ist die Ornithin-Fermentation mit einer Mutante von Micrococcus glutamicus, die einen genetischen Block zwischen Ornithin und Citrullin hat (UDAKA und KINOSHITA, 1958).

Neben der Beeinflussung der zellinternen Regulationsmechanismen der Aminosäure-Biosynthesen mittels genetischer Methoden kann der Syntheseablauf eines bestimmten Produktes auch extrazellulär beeinflußt werden. Hierzu stehen folgende Möglichkeiten zur Verfügung (NÜESCH, 1969):

1.) Die Synthese kann durch Zugabe von Vorstufen des Endproduktes zum Nährmedium beeinflußt werden. So spielt die mikrobielle Transformation, z. B. auch bei der Lysinproduktion aus Diaminopimellinsäure, eine große Rolle (BANNUR und PURANDARE, 1969).

2.) Das Wachstum des Produzenten-Stammes wird mit Hilfe von physikalischen und chemischen Methoden reguliert.

3.) Durch eine Erhöhung der Zellpermeabilität für das entsprechende Endprodukt wird erreicht, daß dieses kontinuierlich aus der Zelle entfernt wird. Auf diese Weise wird die Blockierung der Biosynthese durch die zellinternen Regulationsmechanismen vermieden. Zellen von Micrococcus glutamicus scheiden nur dann große Mengen Glutaminsäure aus, wenn sie unter einem gewissen Biotinmangel kultiviert werden.

Viele Untersuchungen zeigten, daß durch geringe Biotinmengen, verschiedene Detergenzien oder Penicillinzusatz die Permeabilität der Bakterien für Glutaminsäure und andere Aminosäuren bedeutend erhöht wird (DEMAIN und BIRNBAUM, 1968).

Mit Hilfe dieser Erkenntnisse sollte nun bei E. coli K 12 die Möglichkeit untersucht werden, Mutanten mit erhöhter Tryptophan-Produktion spezifisch anzureichern und zu isolieren.

II. Material und Methoden

1. Organismen

Die in dieser Arbeit benutzten und isolierten Stämme sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 1: Organismen, die für die Untersuchungen verwendet wurden

Stamm-Bezeichnung	Eigenschaften	Herkunft
a) Bakterienstämme (E. coli K 12-Stämme):		
W 1485	F^+	W. Vielmetter
P 678	F^-, Thr^-, Leu^-, B_1^-, Gal^-, Lac^-, Xyl^-, S^r, T_6^r, λ^r	W. Vielmetter
MT	P 678 resistent gegen 1 mM 5-MT	diese Arbeit
FMT	MT resistent gegen 1 mM 5-FT	diese Arbeit
all	FMT resistent gegen 1 mM ß-Th und 1 mM p-FPhe	diese Arbeit
all AR	all auxotroph für Phe und/oder Tyr	diese Arbeit
all C	all auxotroph für Cys	diese Arbeit
T	all mit reduzierter Try-ase-Aktivität	diese Arbeit
LA	T prototroph für Thr	diese Arbeit
P	LA prototroph für Leu	diese Arbeit
Ind	P resistent gegen 2 mM Indol	diese Arbeit
IC	Ind auxotroph für Cys	diese Arbeit

Stamm-Bezeichnung	Eigenschaften	Herkunft
YS-57/F'	S^r, His^-, Pro^-, $T1^r$, Try^- F: Try^+, Cys B^+, Col V, Col B	U. Henning
S	IC diploid für Try-Operon durch Sexduktion mit YS-57/F'	diese Arbeit
YFM	YS-57/F' gegen 1 mM 5-MT und 1 mM 5-FT resistent	diese Arbeit
A	IC diploid für Try-Operon durch Sexduktion mit YFM	diese Arbeit
INA	Ind resistent gegen 3 mM Anth	diese Arbeit
IHA	INA resistent gegen 7 mM Anth	diese Arbeit
IMA	IHA resistent gegen 4 mM 5-MAnth	diese Arbeit
b) Saccharomyces cerevisiae - Stamm		
HK 51	Try^-	F. Lingens
c) Bakteriophagen - Stamm		
f_r	Hfr und F^+-spez. RNS-Phage	G. Schramm

2. Chemikalien

Außer den hier aufgeführten wurden Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt, verwendet. Einige Substanzen für die Nährmedien waren dieselben wie bei MÜLLER, 1968.

a) Substanzen für Nährmedien

Bacto Tryptone	Difco Laboratories, Detroit, USA.
Bacto Casamino Acids	Difco Laboratories, Detroit, USA.
Bacto Malt Extract	Difco Laboratories, Detroit, USA.

b) Substanzen des Intermediärstoffwechsels

p-Aminobenzoesäure	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Anthranilsäure	Fluka AG, Buchs, Schweiz
L-Homoserin	Fluka AG, Buchs, Schweiz
D-Ribose	Serva Entwicklungslabor, Heidelberg
Shikimisäure	Fluka AG, Buchs, Schweiz

c) Aminosäure-Antagonisten

DL-p-Aminophenylalanin	Sigma, St. Louis, USA.
L-3,4-Dihydroxyphenylalanin	Serva Entwicklungslabor, Heidelberg
DL-2-Fluorphenylalanin	Fluka AG, Buchs, Schweiz
DL-3-Fluorphenylalanin	Fluka AG, Buchs, Schweiz
DL-4-Fluorphenylalanin	Fluka AG, Buchs, Schweiz
DL-5-Fluortryptophan	Fluka AG, Buchs, Schweiz
DL-6-Fluortryptophan	Fluka AG, Buchs, Schweiz
DL-3-Fluortyrosin	K & K Laboratories, Calif., USA.
3-Methylanthranilsäure	EGA Chemie, Steinheim/Albuch
4-Methylanthranilsäure	EGA Chemie, Steinheim/Albuch
5-Methylanthranilsäure	EGA Chemie, Steinheim/Albuch
DL-5-Methyltryptophan	Fluka AG, Buchs, Schweiz
DL-6-Methyltryptophan	Fluka AG, Buchs, Schweiz
L-3-Nitrotyrosin	EGA Chemie, Steinheim/Albuch
DL-ß-Thienylalanin	Serva Entwicklungslabor, Heidelberg

d) Weitere Chemikalien

Azaserin	EGA Chemie, Steinheim/Albuch
N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin	EGA Chemie, Steinheim/Albuch
Penicillin-G (Na-Salz)	Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt
Tween 40	Serva Entwicklungslabor, Heidelberg
Tween 60	Serva Entwicklungslabor, Heidelberg

3. Nährmedien und Kulturbedingungen

a) Medien für Saccharomyces cerevisiae

Komplettmedium

Yeast Extract	4 g
Malt Extract	10 g
Glucose	4 g
Aqua deion.	1 000 ml
zur Verfest.: Agar	20 g

Der pH-Wert wurde auf 7,3 eingestellt.

Minimalmedium (verändert nach LINGENS und OLTMANNS, 1964)

KH_2PO_4	0,875 g
K_2HPO_4	0,125 g
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0,5 g
NaCl	0,1 g
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	0,1 g
Glycin	0,1 g
$(NH_4)_2SO_4$	1,0 g
Glucose	10,0 g
Spurenlösung	10,0 ml
Aqua deion.	1 000 ml
zur Verfest.: Agar	20,0 g

Spurenlösung

H_3BO_3	50 mg
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	4 mg
KJ	10 mg
$FeCl_3 \times 6\ H_2O$	20 mg
$MnSO_4 \times 1\ H_2O$	40 mg
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	40 mg
Ammoniumhepta-molybdat	20 mg
Biotin	10 mg
Aqua deion.	1 000 ml

b) Escherichia coli wurde auf folgenden Medien gezüchtet

Komplettmedium
(L-Broth nach LENNOX, 1955)

Bacto Tryptone	10,0 g
Yeast Extract	5,0 g
NaCl	5,0 g
Glucose	1,0 g
Aqua deion.	1 000 ml
zur Verfest.: Agar	15,0 g

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

Minimalmedium (nach DAVIS und MINGIOLI, 1950)

KH_2PO_4	3,0 g
K_2HPO_4	7,0 g
tri-Na-citrat x 2 H_2O	0,5 g
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,1 g
$(NH_4)_2SO_4$	1,0 g
Glucose	2,0 g
Aqua deion.	1 000 ml
zur Verfest.: Agar	15,0 g

Bei auxotrophen Stämmen wurden dem Minimalmedium außerdem von jeder benötigten Aminosäure 50 mg/l und von jedem benötigten Vitamin 10 mg/l zugesetzt.

Saline: 0,9 % (G/V) NaCl

Sämtliche Medien wurden 20 min. bei 120° C autoklaviert.

c) Kulturbedingungen

Alle Submerskulturen wurden auf einer rotierenden Schüttelmaschine (120 U/min) in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit seitlichem Einstich, die je 100 ml Medium enthielten, gezüchtet. Die Inkubationstemperaturen betrugen für Sacch. cerevisiae 27° C und für E. coli 37° C. Die Inkubationsdauer betrug für Organismen, die als Impfmaterial verwendet wurden, 15 Std., für Stämme, die auf Tryptophan-Ausscheidung untersucht wurden, 65 Std.. Das Wachstum bei E. coli wurde durch Trübungsmessung mit einem Eppendorf-Photometer bei λ = 546 nm bestimmt. Durch Bestimmen der Zellzahl in der Zählkammer und durch Ausplatten konnte einem Extinktionswert von 0,1 die Zellzahl 10^8 Zellen/ml zugeordnet werden. Die Bestimmung der Glucose im Kulturmedium erfolgte mit Hilfe der Glucotest-Streifen der Firma C. F. Boehringer, Mannheim.

4. Quantitative Bestimmung des Tryptophans

Das gebildete Tryptophan im Kulturmedium der E. coli-Stämme wurde mittels der Tryptophan-auxotrophen Mutante HK 51 von

Sacch. cerevisiae bestimmt. Die Methode des Plattendiffusionstests nach SHOCKMAN, 1963 und ZÄHNER, 1965 wurde folgendermaßen abgewandelt. Der Stamm HK 51 wurde in Komplettmedium angezogen, anschließend wurden die Zellen zweimal mit Saline gewaschen und dann in soviel Saline wieder aufgenommen, daß die Hefesuspension eine Zelldichte von 2×10^8 Zellen/ml aufwies. Von dieser Suspension wurden 10 ml zu 250 ml Hefeminimalmedium bei 40° bis 45° C gegeben. In Portionen von 17,5 ml wurde dieses Medium mit dem Teststamm nun in Petrischalen verteilt. Nach dem Erstarren des Mediums wurden Filterrondellen aufgelegt, die zuvor in den auf Tryptophan-Gehalt zu testenden Lösungen getränkt und anschließend gut getrocknet worden waren. Nach 15 Std. Inkubation der Testplatten wurden dann die Wachstumshöfe ausgemessen, und mit Hilfe einer Eichkurve (Abb. 2a) wurden die dazugehörigen Tryptophan-Konzentrationen ermittelt. Wurden anstatt 17,5 ml nur 5 ml des Mediums mit dem Testorganismus in eine Petrischale gegeben, so konnte dadurch die Empfindlichkeit dieser Bestimmungsmethode beträchtlich erhöht werden (Abb. 2b). Dieser Test ist spezifisch für L-Tryptophan, ein Gemisch aus den 19 biogenen Aminosäuren ohne Tryptophan oder eine Lösung aus Indol und L-Serin ermöglichen kein Wachstum des Teststammes. Bei drei Parallelbestimmungen liegt der prozentuale Fehler dieser Tryptophan-Bestimmungsmethode bei 7,4 %.

5. Quantitative Anthranilsäure-Bestimmung

Die Anthranilsäure wurde spektrophotometrisch bestimmt (LESTER und YANOFSKY, 1961; LINGENS et al., 1967). Dazu wurden 5 ml Kulturlösung mit 1 n Salzsäure auf pH 2 eingestellt und dann mit gleichem Volumen Äthylacetat extrahiert; bei diesem pH-Wert der wässrigen Phase geht die Anthranilsäure quantitativ in die organische Phase über. Im Spektralphotometer (Beckman DB) wurde die Absorption des Äthylacetat-Extrakts bei λ = 320 nm gemessen und mittels einer Eichkurve dann daraus die Anthranilsäure-Konzentration ermittelt. Diese einfache Bestimmung konnte gewählt werden, da keine Substanzen in

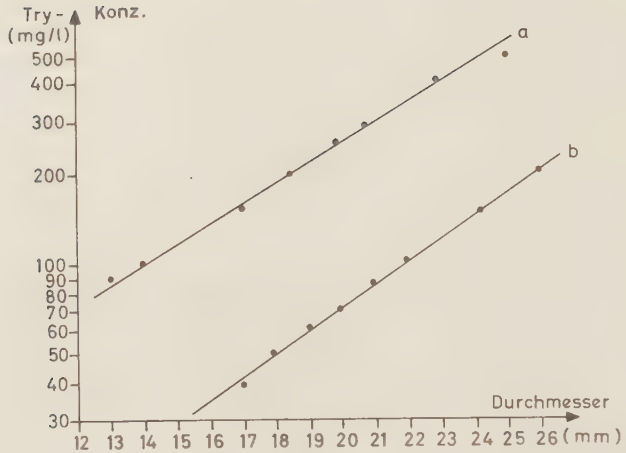

Abb. 2: Eichkurven für die quantitative Tryptophan-Bestimmung mit der Try-auxotrophen Mutante HK 51 von Sacch. cerevisiae im Plattendiffusionstest; a: 17,5 ml Medium und b: 5 ml Medium pro Petrischale

der Nährlösung waren, die den Test störten, wie dünnschichtchromatographisch gezeigt werden konnte.

6. Quantitative Indol-Bestimmung

Indol wurde nach SMITH und YANOFSKY, 1962 kolorimetrisch bestimmt. Die Extinktion wurde bei λ = 546 nm im Eppendorf-Photometer gemessen und aus einer Eichkurve die entsprechende Indol-Konzentration abgelesen.

7. Antagonismus-Teste

a) Kreuztest

Die Ausführung des Kreuztests erfolgte wie bei ZÄHNER et al., 1960 und PORALLA, 1967 beschrieben. Mit Hilfe dieser Testmethode wurde geprüft, welche Substanzen die wachstumshemmende

Wirkung eines Antimetaboliten aufheben können und welcher Art der Antagonismus ist.

b) Biophotometer-Versuche

Das Biophotometer ist ein Gerät zur automatischen Registrierung des Bakterienwachstums in Submerskultur mittels Trübungsmessung (genaue Gerätebeschreibung PORALLA, 1967). Bei allen Versuchen wurden die Küvetten mit 8,0 ml Minimalmedium und 0,1 ml einer gut gewaschenen Suspension (2×10^9 Zellen/ml) von E. coli beschickt, die in Komplettmedium angezogen worden waren. Die Kulturen in den Küvetten wurden bei 37° C und maximaler Frequenz und Amplitude der Magnetrührer inkubiert. Die Zugabe der Antimetaboliten und Metaboliten erfolgte zu den angegebenen Zeiten; die Versuchsdauer betrug 15 Std..

c) Plattendiffusionstest

Dieser Test nach ZÄHNER, 1965 wurde folgendermaßen abgewandelt. Es wurden Testplatten hergestellt, die jeweils in 17,5 ml Minimalmedium 3×10^8 gewaschene E. coli-Zellen und den Antimetaboliten in der minimalen Hemmkonzentration enthielten. Nun wurden Filterrondellen aufgelegt, die in verschiedenen Metaboliten-Lösungen (Konz. 1 mg/ml) getränkt worden waren. Nach 15-stündiger Inkubation der Platten bei 37° C war um die Rondellen, die einen Metaboliten enthielten, der die wachstumshemmende Wirkung des Antimetaboliten im Medium aufheben konnte, ein Wachstumshof zu erkennen.

8. Mutantengewinnung

a) Mutagenese

Zu einer im Komplettmedium exponentiell wachsenden Kultur von E. coli (5×10^8 Zellen/ml) wurden 30 mg/l der hochmutagenen Substanz MNG zugegeben (ADELBERG et al., 1965; BOTSTEIN und JONES, 1969). Die Einwirkungsdauer des Mutagens betrug 4 min.. Die Kultur wurde während dieser Zeit auf der rotierenden Schüttelmaschine bei 37° C inkubiert. Danach

wurden 5 ml dieser Bakterienkultur abzentrifugiert, zweimal mit Saline gewaschen und in 5 ml Saline resuspendiert. Zur genotypischen Ausprägung der erzeugten Mutanten wurden 100 ml Komplettmedium mit 0,5 ml dieser gewaschenen Suspension beimpft und 16 Std. inkubiert.

b) Mutantenselektion

α) Isolierung von Mutanten, die gegen Antimetaboliten resistent sind

Von der auf Komplettmedium 16 Std. gewaschenen Kultur (Abschnitt a) wurden 5 ml zweimal mit Saline gewaschen und in 5 ml Saline aufgenommen. Von dieser Suspension wurden jeweils 0,1 ml auf Petrischalen, die 17,5 ml Minimalmedium mit dem Antimetaboliten in einer Konzentration von 10^{-3} M enthielten, ausgestrichen (ADELBERG, 1958). Nach 48 Std. Inkubation bei 37° C waren unter den resistenten Kolonien einige, die von einem Hof sekundärer Kolonien (Satellitenkolonien) umgeben waren. Der Hof deutete darauf hin, daß die resistente Kolonie eine Substanz ausschied, die die Hemmwirkung des Antimetaboliten für die empfindlichen Satellitenkolonien aufhob (HILL und SCHLEGEL, 1969); es wurden deshalb solche Kolonien isoliert. Durch einen Verdünnungsausstrich auf Platten mit Minimalmedium und dem Antagonisten wurden die begleitenden Wildtyp-Zellen von den resistenten Zellen abgetrennt.

ß) Isolierung auxotropher Mutanten

Der Mutantenselektion ging eine Mutantenanreicherung mittels der Penicillintechnik (DAVIS, 1948) voraus. Die Zellen von 10 ml der 16 Std. auf Komplettmedium angezogenen Kultur (Abschnitt a) wurden zweimal mit einer 10^{-2} M $MgSO_4$-Lösung gewaschen und in soviel $MgSO_4$-Lösung resuspendiert, daß die Zellzahl 5 x 10^8 Zellen/ml betrug. Anschließend wurde diese Zellsuspension zum "Aushungern" der Mutanten 3 Std. bei 37°C auf der rotierenden Schüttelmaschine inkubiert. Dann wurden zwei 100 ml-Erlenmeyerkölbchen, die beide je 10 ml Minimalmedium enthielten, mit 2 x 10^8 Zellen dieser Suspension be-

impft; eines der Kölbchen erhielt außerdem noch 2 000 Einheiten Penicillin/ml. Beide Kölbchen wurden nun so lange inkubiert, bis sich die Extinktion der Kultur ohne Penicillin auf das 5 - 10fache erhöht hatte. Durch Zugabe von Penicillinase (800 Einheiten) wurde dann das Penicillin der anderen Kultur abgebaut und die Zellen 1 : 10 und 1 : 100 verdünnt. Von diesen Verdünnungen wurden jeweils 0,1 ml pro Petrischale ausgestrichen, die neben dem Minimalmedium noch die Zusätze enthielt, für welche die Mutanten auxotroph sein sollten. Nach 48 Std. Inkubation wurde das Koloniemuster dieser Platten mit dem Lederberg-Stempel (LEDERBERG und LEDERBERG, 1952) zunächst auf eine Platte mit Minimalmedium und dann auf eine mit Minimalmedium und Zusätzen übertragen. Von den Petrischalen mit Minimalmedium und Zusätzen wurden nach 16 Std. Inkubation diejenigen Kolonien, die auf den entsprechenden Platten ohne den Zusätzen kein Wachstum zeigten, abgeimpft und zur Kontrolle noch einem Strichtest unterworfen (LINGENS und OLTMANNS, 1964).

c) Identifizierung der auxotrophen Mutanten

Die isolierten Mutanten wurden 16 Std. in Komplettmedium angezogen, zweimal mit Saline gewaschen und darin suspendiert (3×10^8 Zellen/ml). Von dieser Suspension wurde 1 ml in jede Petrischale gegeben und mit 17,5 ml 40° - 45° C warmem Minimalagar vermischt. Nach Erstarren des Agars wurden Filterrondellen aufgelegt, die mit den Zusätzen (Abschnitt b ß) einzeln und in allen möglichen Kombinationen getränkt worden waren (Konz. der Lösungen 1 mg/ml). Nach 16 Std. Inkubation konnte abgelesen werden, welche Substanzen die einzelnen Mutanten zum Wachstum benötigen.

9. Sexduktion

Heterogenote Stämme, die diploid sind für das Tryptophan-Operon, wurden durch eine Sexduktion mit dem Stamm YS-57/F' erhalten, der die episomalen Marker F, ColB, ColV, $CysB^+$ und Try^+ trägt. Der F'-Transfer wurde folgendermaßen ausgeführt:

Der Rezipienten-Stamm IC/F^- und der Donor-Stamm YS-57/F' wurden 16 Std. in Komplettmedium gezüchtet. Der F^--Stamm wurde dann abzentrifugiert und in 1/10 Komplettmedium des Ausgangvolumens resuspendiert. Der F'-Stamm wurde mit Komplettmedium 1 : 1 verdünnt und nochmals 1 Std. inkubiert, damit er sich bei der Sexduktion in der exponentiellen Wachstumsphase befand. Für die Sexduktion wurden dann 0,2 ml der konzentrierten Rezipienten-Stamm-Suspension mit 2 ml der F'-Kultur gemischt und 1 Std. stehend bei 37° C inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit Saline gewaschen, 1 : 100 verdünnt und auf ein Minimalmedium ausgestrichen, das selektiv nur den Rekombinaten das Wachstum ermöglichte.

Stamm	Merkmale	Wachstum auf Minimalmedium
IC	F^-, Cys^-	wächst nicht
YS-57/F'	F^+, His^-, Pro^-	wächst nicht
IC/F'	F^+	wächst

Wie diese Aufstellung zeigt, konnte der Rezipienten-Stamm auf Minimalmedium nicht wachsen, weil er Cystein-auxotroph war, und der Donor-Stamm ebenfalls nicht, da dieser Pro und His zum Wachstum benötigte. Hatte der Rezipienten-Stamm eine Mutation im CysB-Gen, das dicht neben dem Try-Operon auf dem E. coli Chromosom lokalisiert ist (TAYLOR, 1970), so wurde der Stamm durch die Aufnahme des Episoms des Donor-Stamms YS-57/F' für Cys wieder prototroph und konnte somit auf Minimalmedium wachsen. Dieser Stamm war folglich heterogenot diploid für das Try-Operon, das eine befand sich auf dem Bakterienchromosom und das andere auf dem Episom.

10. Tests auf F-Faktor

a) Eliminierung des F-Partikels durch Acridinorange

Durch Zugabe von Acridinorange ins Kulturmedium kann man selektiv die Replikation des F-Faktors hemmen (WILLETTS, 1967), ohne die Zellvermehrung zu beeinflussen. Dadurch ist es mög-

lich, die F-Partikel aus den Zellen zu eliminieren. Zu 1 ml Komplettmedium, das auf pH 7,6 eingestellt war und 25 mg/l Acridinorange enthielt, wurden 10^4 Zellen des vermutlich heterogenot diploiden Stammes IC/F' gegeben. Das Kulturröhrchen wurde mit Aluminium-Folie umwickelt und 2 Tage bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde auf Kolonien selektioniert, die wie der Rezipienten-Stamm IC (Abschnitt 9) Cystein-auxotroph waren. Benötigten über 90 % der Zellen nach der Acridinorange-Behandlung wieder Cys zum Wachstum, so war damit gezeigt, daß der prototrophe Ausgangsstamm tatsächlich das Episom mit dem $CysB^+$-Gen und damit auch mit dem Try-Operon besaß.

b) f_r-Phagen-Test

Der f_r-Phage enthält eine einsträngige RNS und kann nur Bakterien infizieren, die F-Pili besitzen, d. h. die F^+- oder Hfr-Stämme sind, während F^--Stämme von diesem Phagen nicht infiziert werden können (ZINDER, 1965). Mit Hilfe dieses f_r-Phagens kann bei E. coli-Stämmen nachgewiesen werden, ob sie einen F-Faktor besitzen. Für diesen Test wurden 1 - 2 Tropfen einer Bakterienkultur, die 16 Std. in Komplettmedium vorgezüchtet worden war, mit einem Tropfen eines f_r-Phagenlysates (Titer: 10^6 Phagen/ml) in 2,5 ml Weichagar (E. coli Komplettmedium mit 7,5 g Agar pro 1 000 ml) vermischt und auf eine Platte mit 17,5 ml Komplettmedium ausgegossen. Nach dem Erstarren der Weichagar-Oberschicht wurden die Platten 5 - 7 Std. bei 37° C inkubiert; danach waren kleine klare Plaques zu sehen, wenn der Bakterienstamm ein F-Partikel enthielt.

11. Test auf Derepression der Tryptophan-Biosynthese-Enzyme

Da die Derepression alle fünf Enzyme des Try-Operons in gleicher Weise beeinflußt (ITO und CRAWFORD, 1965; IMAMOTO, 1968), wurde bei diesem Test nur die Aktivität der Tryptophan-synthetase bestimmt. Der Enzymtest wurde nach SMITH und YANOFSKY, 1962 ausgeführt. Für die Anzucht der Zellen wurden 100 ml Minimalmedium, das 50 g/l Glucose zur katabolischen Repression der Tryptophanase und je 100 mg/l Phenylalanin und Tyrosin

zur Repression der Chorismatmutase enthielt, mit 1 ml einer 16 Std. alten Kultur beimpft (MORSE und YANOFSKY, 1969a). Außerdem wurden dem Kulturmedium beim Test auf Derepression der Enzyme der Tryptophan-Biosynthese noch 100 mg/l Tryptophan zugesetzt. Nach 6 Std. Inkubation auf der Schüttelmaschine wurden 8 ml der Kultur abzentrifugiert, zweimal mit 0,05 M Phosphat-Puffer (pH 7,8) gewaschen und in 1 ml dieses Puffers aufgenommen. Um die Permeabilität der Zellen für den Enzymtest zu erhöhen, wurden dieser Suspension 2 Tropfen Toluol zugesetzt und 10 min. bei 37° C kräftig geschüttelt (HERSCHMAN und HELINSKI, 1967). Danach wurden 0,5 ml davon mit 0,5 ml der folgenden Substratlösung gemischt:

96 mg/l Indol
16 g/l DL-Serin
30 mg/l Pyridoxal-Phosphat
gelöst in 0,05 M Phosphat-Puffer (pH 7,8)

Der Ansatz wurde 30 min. bei 37° C inkubiert, dann wurde die Reaktion durch Zusatz von 0,1 ml 1n NaOH gestoppt und das nicht umgesetzte Indol quantitativ bestimmt.

Definition einer Enzymeinheit: 1 Enzymeinheit ist die Enzymmenge, die 0,1 µmol Indol unter den beschriebenen Bedingungen zu Tryptophan umsetzt.

Definition der spez. Aktivität: Die spez. Aktivität ist die Anzahl der Enzymeinheiten pro mg Protein.

Das Protein wurde nach LOWRY et al., 1951 bestimmt. Die Zellen wurden hierzu mit dem Ultraschallgerät aufgeschlossen (PORALLA, 1967).

12. Bestimmung der Tryptophanase-Aktivität

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in Minimalmedium mit Glycerin als C-Quelle und 500 mg/l Tryptophan zur Induktion der Tryptophanase. Die Zellen wurden in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet, einmal mit kaltem 0,2 M Phosphat-

Puffer gewaschen und darin suspendiert. 2 ml dieser Suspension wurden dann wie in Abschnitt 11 mit Toluol behandelt. Die Tryptophanase-Aktivität wurde nach BEGGS und LICHSTEIN, 1965 in folgendem Reaktionsansatz bestimmt:

0,2 ml 0,2 M Phosphat-Puffer (pH 7,8)
0,1 ml Pyridoxal-Phosphat-Lösung (100 mg/l)
1,7 ml Zellsuspension
0,1 ml 0,05 M L-Tryptophan-Lösung

Dieses Gemisch wurde 10 min. bei 37° C inkubiert, danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,2 ml einer 25 % Trichloressigsäure gestoppt und das gebildete Indol quantitativ bestimmt.

Definition einer Enzymeinheit: 1 Tryptophanase-Einheit ist die Enzymmenge, die 1 γ Indol pro 10 min. unter den genannten Bedingungen bildet (GUNSALUS et al., 1955).

Definition der spez. Aktivität: Die spez. Aktivität der Tryptophanase ist die Anzahl der Enzymeinheiten pro mg Protein.

III. Ergebnisse

1. Isolierung von Mutanten, bei denen die Regulationsmechanismen der Tryptophan-Biosynthese defekt sind

a) 5-MT resistente Mutanten

Es ist bekannt, daß Mutanten, die resistent sind gegen einen Antimetaboliten, häufig den dazugehörigen Metaboliten in erheblich größerer Menge bilden und anhäufen als der Wildstamm (SCHERR und RAFELSON, 1962). So berichteten COHEN und JACOB, 1959, MOYED, 1960 und LIM und MATELES, 1964, daß Mutanten von E. coli, die gegen 5-MT resistent sind, geringe Mengen Tryptophan und Indol ins Kulturmedium ausscheiden.

Im Kreuztest wurde zunächst untersucht, welche Substanzen die wachstumshemmende Wirkung von 5-MT auf E. coli K 12 aufheben können. Es zeigte sich, daß die Hemmung durch Try und Indol unkompetitiv aufgehoben werden kann, während Anth, p-Aminobenzoesäure, Phe, Shikimisäure, Ser und Tyr keine aufhebende Wirkung haben. Die nichtkompetitive Aufhebung der 5-MT-Hemmung durch Indol weist darauf hin, daß 5-MT einen Schritt in der Try-Biosynthese hemmt, der vor dem Indol liegt. MOYED, 1960 fand, daß das 5-MT als "falscher Feedback-Hemmer" auf die Anthranilat-synthetase wirkt.

Ausgehend vom Stamm P 678 wurden nach Mutagenbehandlung mit MNG 10 Mutanten isoliert, die gegen 10^{-3} M 5-MT resistent sind. Wie aus Tabelle 2 zu ersehen ist, schieden alle 10 Mutanten nach 65 Std. Inkubation geringe Mengen Try ins Kulturmedium aus, während beim Ausgangsstamm P 678 kein Try nachgewiesen werden konnte (LESTER und YANOFSKY, 1961).

Die Try-Produktion der Mutante MT_5 konnte durch Zugabe von Anth, Shikimisäure, Phe oder Tyr zum Minimalmedium in einer Konzentration von 1 g/l nicht wesentlich gesteigert werden. Auch die Erhöhung der Glucose-Konzentration im Medium (bis

Tabelle 2: Tryptophan-Ausscheidung einiger 5-MT resistenter Mutanten von E. coli K 12

Stamm	Try-Ausscheidung (mg/l)	Stamm	Try-Ausscheidung (mg/l)
MT_1	2	MT_7	2
MT_2	2	MT_8	1,5
MT_3	3	MT_9	1,5
MT_4	2,5	MT_{10}	2,5
MT_5	3		
MT_6	2,5	P 678	0

zu 10 g/l) führte bei dem Stamm MT_5 zu keiner weiteren Steigerung der Try-Ausscheidung.

b) 5-FT resistente Mutanten

BANDIERA et al., 1967 konnten nachweisen, daß E. coli-Mutanten, die resistent sind gegen 5-MT und außerdem gegen 5-FT, einem weiteren Try-Antimetaboliten, wesentlich mehr Try ausscheiden als Stämme, die nur 5-MT resistent sind. Es wurde deshalb versucht, Mutanten zu gewinnen, die auch in Gegenwart von 5-FT wachsen können.

Die wachstumshemmende Wirkung von 5-FT wurde im Kreuztest auch - wie die von 5-MT - nur durch Try und Indol in unkompetitiver Weise aufgehoben. Die Substanzen Anth, Shikimisäure, Phe und Tyr bewirkten keine Aufhebung der bakteriostatischen Wirkung von 5-FT. Der Try-Antagonist 5-FT soll das zweite Enzym der Try-Biosynthesekette, die Phosphoribosylanthranilat-transferase, hemmen (SHIVE und SKINNER, 1963); dieses Enzym unterliegt auch einer Feedback-Hemmung durch Try (ITO und YANOFSKY, 1969).

Von dem Stamm MT_5 wurden 8 Spontanmutanten isoliert, die Resistenz gegen 10^{-3} M 5-FT zeigten. Es gelang auf diese Weise, die Try-Ausscheidung maximal um den Faktor 16 zu steigern (Tabelle 3).

Tabelle 3: Tryptophan-Produktion einiger 5-MT und 5-FT resistenter Mutanten von E.coli K 12 in Minimalmedium

Stamm	Try-Ausscheidung (mg/l)	Stamm	Try-Ausscheidung (mg/l)
FMT_1	50	FMT_5	7,5
FMT_2	35	FMT_6	5
FMT_3	40	FMT_7	6
FMT_4	25	FMT_8	9

Trotz mehrerer Ansätze mit und ohne MNG-Behandlung konnte vom Stamm P 678 keine Mutante isoliert werden, die nur gegen 10^{-3} M 5-FT resistent ist. Auch BANDIERA et al., 1967 gelang es nicht, solche Mutanten zu gewinnen. Ein möglicher Grund für diese ungewöhnliche Eigenschaft des 5-FT wird in der Diskussion erörtert.

Der Stamm FMT_1 war kreuzresistent gegen 10^{-3} M 6-MT und 10^{-3} M 6-FT. Diese beiden Try-Analogen scheinen somit an den gleichen Stellen im Stoffwechsel einzugreifen wie 5-MT und 5-FT.

c) Untersuchung der Mutanten auf Derepression der Try-Biosynthese-Enzyme

Um zu ermitteln, welche Regulationsmechanismen der Try-Biosynthese in den Mutanten MT_5 und FMT_1 ausgefallen sind, wurden diese Stämme auf Derepression der Tryptophan-synthetase untersucht. Wie die Tabelle 4 zeigt, ist dieses Enzym der 5-MT resistenten Mutante MT_5 noch ebenso durch Try reprimierbar wie das des Wildtyps P 678. Die Resistenz gegen 5-MT und die damit verbundene Try-Ausscheidung des Stammes MT_5 beruht somit sehr wahrscheinlich auf einen Ausfall der Feedback-Hemmung des Endproduktes auf die Anthranilat-synthetase (MOYED, 1960; COHEN, 1965; HILL und SCHLEGEL, 1969). Die zweite Mutation, die die 5-FT-Resistenz zur Folge hatte, führte in der Mutante FMT_1 zur konstitutiven Bildung der

Try-synthetase und damit auch der gesamten Try-Biosynthese-Enzyme. In dieser dereprimierten Mutante wird die 10-fache Menge an Enzymen dieses Biosyntheseweges im Vergleich zum Wildtyp oder zum Stamm MT_5 gebildet (LIM und MATELES, 1964; MORSE und YANOFSKY, 1969b). Die relativ hohe Try-Ausscheidung des Stammes FMT_1 ist nach diesen Ergebnissen die Folge zweier Mutationen, die zum Ausfall der beiden Regulationsmechanismen, der Feedback-Hemmung und der Repression, im Try-Biosyntheseweg geführt haben (BANDIERA et al., 1967).

Tabelle 4: Test auf Derepression der Tryptophan-synthetase in den E. coli-Stämmen P 678, MT_5 und FMT_1

Stamm	Zusätze zum Minimalmedium	Spez. Aktivität der Tryptophan-synthetase
P 678	keine	1,6
P 678	100 mg/l L-Tryptophan	0,4
MT_5	keine	1,8
MT_5	100 mg/l L-Tryptophan	0,4
FMT_1	keine	15,3
FMT_1	100 mg/l L-Tryptophan	14,2

2. Isolierung von Mutanten, die resistent sind gegen einige Phenylalanin- und Tyrosin-Antimetaboliten

In E. coli K 12 wird der erste Schritt der Aromatenbiosynthese von drei Isoenzymen katalysiert, deren Synthese und Aktivität durch je eine der drei aromatischen Aminosäuren Phe, Tyr oder Try reguliert wird (Abb. 1). Das Phe-sensitive DAHP-synthetase-Isoenzym macht in E. coli K 12 90 % der Gesamtaktivität der DAHP-Synthetase aus (JENSEN et al., 1967; BROWN, 1968). Die Aktivität dieses Isoenzyms wird jedoch durch die hohe intrazelluläre Phe-Konzentration teilweise gehemmt (LIM und MATELES, 1964; BROWN und DOY, 1966). Es wurde deshalb versucht, Mutanten zu isolieren, in denen dieses Phe-sensitive DAHP-synthetase-Isoenzym konstitutiv ge-

bildet wird und in seiner Aktivität nicht mehr durch Phe gehemmt werden kann. Diese Stämme könnten mehr Try produzieren, weil sie größere Mengen an Zwischenprodukten des Grundbiosyntheseweges zu bilden vermögen.

Vom Stamm FMT_1 wurden Mutanten gewonnen, die gegen die beiden Phe-Antagonisten p-FPhe und ß-Th resistent sind. Die wachstumshemmende Wirkung dieser beiden Antimetaboliten auf E.coli wurde im Kreuztest unkompetitiv in gleichem Maße durch Phe oder Tyr aufgehoben; auch Try führte in hoher Konzentration zur Aufhebung der Bakteriostase dieser Substanzen. Dies ist ein Hinweis für das Zusammenspiel dieser drei Aminosäuren bei der Regulation ihrer Biosynthese. ß-Th reprimiert und hemmt in E. coli wie der Metabolit Phe die Phe-sensitive DAHP-synthetase (EZEKIEL, 1965; JENSEN, 1969), während p-FPhe außerdem noch als Tyr-Antagonist wirkt (PREVIC und BINKLEY, 1964; GOLLUB und SPRINSON, 1969).

Wie aus der folgenden Tabelle 5 zu ersehen ist, schieden die 8 Mutanten vom Stamm FMT_1, die gegen 10^{-3} M p-FPhe und 10^{-3} M ß-Th resistent sind, nicht wie erwartet mehr Try ins Minimalmedium aus, sondern weniger als der Ausgangsstamm FMT_1. Diese Abnahme der Try-Produktion um 10 - 60 % bei den Mutanten all_1 bis all_8 ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß diese Stämme neben Try auch noch Phe und/oder Tyr ins Kulturmedium ausscheiden (siehe Aminosäure-Produktion der Mutante IHA_{16}) (EZEKIEL, 1965; JENSEN, 1969).

Tabelle 5: Tryptophanbildung der p-FPhe und ß-Th resistenten Mutanten vom Stamm FMT_1

Stamm	Try-Ausscheidung (mg/l)	Stamm	Try-Ausscheidung (mg/l)
all_1	45	all_5	30
all_2	20	all_6	35
all_3	30	all_7	28
all_4	35	all_8	25

Der Stamm all_1 zeigte außerdem Resistenz gegen die Tyr-Antagonisten L-3,4-Dihydroxyphenylalanin, L-3-Nitrotyrosin und DL-p-Aminophenylalanin und den Phe-Antimetaboliten DL-3-Fluorphenylalanin jeweils in einer Konzentration von 10^{-3} M (SMITH et al., 1964; RAVEL et al., 1965). Die Phe- und Tyr-Analogen DL-2-Fluorphenylalanin und DL-3-Fluortyrosin übten dagegen in einer Konzentration von 10^{-3} M eine starke Wachstumshemmung auf all_1 aus.

Die bakteriostatische Wirkung von DL-2-Fluorphenylalanin konnte im Kreuztest nur durch Phe aufgehoben werden, während Tyr die Hemmwirkung noch verstärkte. Diese Substanz ist folglich ein reiner Phe-Antagonist im Gegensatz z.B. zu p-FPhe und ß-Th, deren Hemmwirkungen neben Phe außerdem durch Tyr und zum Teil durch Try aufgehoben werden können. Nach SMITH et al., 1964 wirkt das DL-2-Fluorphenylalanin sehr stark als falscher Feedback-Hemmer auf die Phe-sensitive DAHP-synthetase. Mutanten vom Stamm all_1, die gegen 10^{-3} M DL-2-Fluorphenylalanin resistent sind, schieden zwischen 26 und 40 mg/l Try ins Medium aus. Organismen vom Stamm all_3, die gegen 10^{-3} M DL-3-Fluortyrosin, einem reinen Tyr-Antimetaboliten (NESTER, 1968) resistent sind, bildeten nur 28 bis 42 mg/l Try. Es gelang somit durch die Deregulation des Grundzweiges der Aromatenbiosynthese nicht, die Try-Ausscheidung des Stammes FMT_1 weiter zu steigern.

3. Untersuchung einiger auxotropher Mutanten auf Try-Ausscheidung

a) Phe- und/oder Tyr-auxotrophe Mutanten

DAVIS, 1950 und ZALKIN, 1967 fanden, daß auxotrophe Mutanten von E. coli und Salmonella typhimurium, die einen Block in einem der Endzweige der Biosynthese aromatischer Aminosäuren hatten, das Endprodukt des einen oder beider anderer Zweige ausscheiden. Diese Überproduktion von Endprodukten war nicht durch den Verlust der Regulationsmechanismen dieser Biosynthesewege bedingt, sondern sie war auf die Erhöhung der

"steady-state-Konzentration" der Chorisminsäure zurückzuführen. Da die Feedback-Hemmung auf das Enzym durch das Endprodukt mit steigender Substratkonzentration vermindert wird, führt die Konzentrationszunahme der Chorisminsäure zu einer Überproduktion und damit Ausscheidung von aromatischen Aminosäuren. LINGENS et al., 1967 konnten nachweisen, daß in Mutanten von Saccharomyces cerevisiae, die für Phe und Tyr auxotroph waren, die Aktivität der Anthranilat-synthetase im Vergleich zum Wildstamm stark erhöht war. Es wurde deshalb versucht, Mutanten vom Stamm all_1 zu isolieren, die für Phe und/oder Tyr auxotroph waren. Bei solchen Mutanten konnte außerdem untersucht werden, inwieweit eine mögliche Phe- und/oder Tyr-Ausscheidung die Try-Produktion des Stammes all_1 beeinflußt.

Es wurden folgende 6 unabhängig voneinander induzierte Mutanten vom Stamm all_1 erhalten:

all AR_1 (Phe^- und Tyr^-), all AR_2 (Phe^- und Tyr^-), all AR_3 (Phe^- und Tyr^-), all AR_4 (Phe^-), all AR_5 (Phe^-), all AR_6 (Tyr^-).

Diese auxotrophen Stämme wurden bei verschiedenen Konzentrationen von Phe und/oder Tyr im Minimalmedium auf Try-Ausscheidung getestet. Wie die Tabelle 6 zeigt, ist die Try-Bildung dieser auxotrophen Mutanten nicht wesentlich höher als die des prototrophen Stammes all_1. Die Ergebnisse sprechen aber zum Teil für die Richtigkeit der Annahme, daß die geringe Abnahme der Try-Produktion des Stammes all_1 im Vergleich zu der des Stammes FMT_1 dadurch bedingt war, daß all_1 neben Try noch Phe und/oder Tyr im Überschuß bildet. Enthielt das Kulturmedium die benötigten Aminosäuren nur in sehr geringer Konzentration (10^{-6} M oder 10^{-5} M), so war das Wachstum der auxotrophen Mutanten sehr gering, und entsprechend war die Try-Bildung niedrig. Wurden Phe und/oder Tyr in größeren Mengen dem Medium zugegeben (10^{-4} M oder 10^{-3} M), so wuchsen die Mutanten sehr gut (4×10^9 Zellen/ml) und schieden entsprechend mehr Try aus.

Tabelle 6: Tryptophanproduktion einiger Phe- und/oder Tyr-auxotropher Mutanten des Stammes all_1

Stamm	Try-Ausscheidung (mg/l) bei verschiedenen Konzentrationen von Phe und/oder Tyr				
	0	10^{-6} M	10^{-5} M	10^{-4} M	10^{-3} M
all AR_1	0	0	8	60	58
all AR_2	0	0	3	43	45
all AR_3	0	1	5	15	20
all AR_4	0	7	25	48	46
all AR_5	0	9	18	36	34
all AR_6	0	0	5	63	60
all_1	45	46	48	45	42

Eine Zugabe der Aminosäuren Phe und Tyr im Überschuß führte zu keiner Hemmung der Try-bildung; dies ist ein Hinweis dafür, daß in diesen Mutanten der Grundzweig der Aromatenbiosynthese dereguliert ist und keiner negativen Kontrolle mehr durch die Endprodukte Phe, Tyr oder Try unterliegt.

b) Cys-auxotrophe Mutanten

Für den letzten Schritt der Try-Biosynthese wird Ser benötigt, es muß deshalb für eine hohe Try-Produktion diese Aminosäure in entsprechend großer Menge in der Bakterienzelle gebildet werden und für die Try-Synthese zur Verfügung stehen. Da Ser unter anderem auch für die Cys-Biosynthese benötigt wird, wurde versucht, diesen Ser-Verbrauch in der Zelle dadurch zu hemmen, daß vom Stamm all_1 Cys-auxotrophe Mutanten isoliert wurden.

Die maximal ausgeschiedene Try-Menge war bei all diesen Mutanten etwa gleich (20 - 28 mg/l) (Tab. 7). Sie betrug somit nur circa 50 % von der des Ausgangsstammes all_1. Ein Grund für diese Abnahme der Try-Bildung könnte darin bestehen, daß das dem Kulturmedium zugesetzte Cys hemmend auf die Ser-Biosynthese wirkt und damit indirekt die Try-Synthese beeinflußt. Es wurde deshalb in folgendem Versuch untersucht, welchen

Tabelle 7: Tryptophanbildung einiger Cys-auxotropher Mutanten des Stammes all_1

Stamm	Try-Ausscheidung (mg/l)	Stamm	Try-Ausscheidung (mg/l)
all C_1	20	all C_6	25
all C_2	22	all C_7	22
all C_3	25	all C_8	26
all C_4	20	all C_9	28
all C_5	23	all C_{10}	24

Einfluß das Cys auf das Wachstum und die Try-Produktion bei der Cys-auxotrophen Mutante all C_3 und dem Cys-prototrophen Stamm all_1 hat. Es wurden dem Minimalmedium nach dem Animpfen verschiedene Mengen Cys zugesetzt und nach 65 Std. Inkubation die Zellzahl und das ausgeschiedene Try bestimmt. Die Versuchsergebnisse sind in der Abb. 3 dargestellt.

Wie aus der Abb. 3 zu ersehen ist, ist die Try-Bildung der Mutante all C_3 weitgehend nur abhängig vom Wachstum, und dieses ist innerhalb bestimmter Bereiche abhängig von der Cys-Konzentration im Medium. Da bei hohen Cys-Konzentrationen (10^{-4} und 5×10^{-4} M) die Try-Ausscheidung nicht abnahm, scheint das Cys weder direkt noch indirekt die Try-Biosynthese zu hemmen. Diese Vermutung wird durch die Befunde bei dem Stamm all_1 gestützt, daß dieser Organismus völlig unabhängig von der Cys-Konzentration im Medium gleiche Mengen an Try produziert. Mehr als 10^{-3} M Cys im Kulturmedium führen zu einer Wachstumshemmung und damit auch zu einer Reduzierung der Try-Ausscheidung (NAGY et al., 1969). Stämme von all C, die von Cys^- zu Cys^+ revertiert waren, schieden wieder ebensoviel Try aus wie der Stamm all_1. Welcher zusätzliche Regulationsmechanismus oder welches angehäufte Zwischenprodukt in den Cys-auxotrophen Mutanten die Reduzierung der Try-Bildung bewirkte, ist bisher noch ungeklärt.

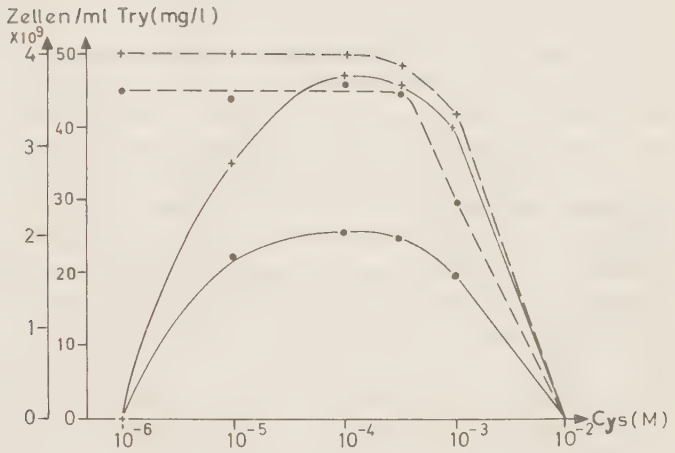

Abb. 3: Abhängigkeit des Wachstums (+) und der Try-Ausscheidung (·) von der Cys-Konzentration im Minimalmedium bei den Stämmen all C_3 (——) und all_1 (---)

4. Beseitigen des Try-Abbaus

a) Isolierung von Mutanten mit stark reduzierter Tryptophanase-Aktivität

In E. coli ist ein Enzym, die Tryptophanase, vorhanden, das Try zu Indol, Brenztraubensäure und Ammoniak abbaut. Die Synthese dieses katabolischen Enzyms wird durch geringe Mengen Try (1 - 2 mg/l) induziert (GARTNER und RILEY, 1965; PASTAN und PERLMAN, 1969). Die Try-ase ist ein Beispiel für einen enzymatischen Kontrollmechanismus, der die Konzentration eines bestimmten Metaboliten über den Abbau reguliert.

Wurden dem Stamm all_1 1 mg/ml Try ins Kulturmedium zugegeben, so konnten nach 48 Std. Inkubation nur noch 0,3 % des zugesetzten Try wiedergefunden werden. Das Try abbauende Enzym

macht es somit äußerst schwierig, einen Stamm von E. coli zu finden, der viel Try im Medium anhäuft. Es wurde deshalb versucht, Mutanten vom Stamm all_1 zu isolieren, die keine aktive Try-ase mehr besitzen. Nach der Mutagenbehandlung wurde zur Anreicherung solcher Mutanten, wie bei der Selektion auxotropher Stämme, die Penicillintechnik angewandt. Das Selektionskriterium war hierbei, Try als einzige N-Quelle nicht verwerten zu können (LIM und MATELES, 1964), da der Stamm all_1 auf Minimalmedium mit Try als einziger C-Quelle nicht wachsen konnte. GARTNER und RILEY, 1965 und KARLSTRÖM, 1965 verwendeten als Merkmal solcher Mutanten dagegen die Nicht-Verwertbarkeit von Try als einzige C-Quelle. Aus mehreren Mutationsansätzen wurden 40 Kolonien isoliert, die auf Platten mit Minimalmedium und Try als einziger N-Quelle kein Wachstum zeigten. Die meisten dieser Mutanten zeigten jedoch in Submerskultur bei Zusatz von 10^{-3} M Try, daß sie noch in der Lage waren, das Try abzubauen. Bei drei Mutanten war die abgebaute Try-Menge sehr gering, und wie die folgende Tabelle 8 zeigt, hatten diese 3 Stämme T_1, T_2 und T_3 eine stark verminderte Tryptophanase-Aktivität.

Tabelle 8: Tryptophanase-Aktivität in den E. coli-Stämmen P 678, all_1, T_1, T_2 und T_3

Stamm	Spez. Aktivität der Tryptophanase
P 678	210
all_1	206
T_1	10
T_2	17
T_3	24

Es ist sehr schwierig, Mutanten von E. coli zu isolieren, die keine aktive Try-ase mehr besitzen, da das Wachstum der Zellen auf Petrischalen mit Minimalmedium und Try als einziger N-Quelle durch das Indol, das bei der Try-Spaltung entsteht, sehr stark gehemmt wird (KARLSTRÖM, 1965).

b) Katabolische Repression der Tryptophanase

Einige katabolische, induzierbare Enzyme in E. coli unterliegen der katabolischen Repression. Die Synthese dieser Enzyme wird auch bei Anwesenheit der entsprechenden Induktoren durch bestimmte Produkte des Intermediärstoffwechsels reprimiert (McFALL und MANDELSTAM, 1963). In den letzten Jahren wurde gefunden, daß das cyklische-3'5'-AMP eine Rolle bei der katabolischen Repression spielt (ULLMANN und MONOD, 1968; DeCROMBRUGGHE et al., 1969; PASTAN und PERLMAN, 1969). So wird das Try abbauende Enzym, Try-ase, in seiner Synthese durch die katabolische Repression gehemmt, wenn Glucose als C-Quelle im Medium vorhanden ist (FREUNDLICH und LICHSTEIN, 1960; McFALL und MANDELSTAM, 1963; BEGGS und LICHSTEIN, 1965; SATO et al., 1969).

Zunächst wurde die Try-Produktion des Stammes all_1 in Minimalmedium mit verschiedenen C-Quellen untersucht. Wie die Tabelle 9 zeigt, konnte in den Kulturmedien,die keine Glucose als C-Quelle enthielten, nach 65 Std. Inkubation des Stammes all_1 kein Try mehr nachgewiesen werden, wohl aber sein Abbauprodukt Indol.

Tabelle 9: Try- und Indol-Bildung des Stammes all_1 in Medien mit verschiedenen C-Quellen

C-Quelle des Minimalmediums (10^{-2} M)	Zellzahl (Zellen/ml)	Try (mg/l)	Indol (mg/l)
Glucose	$4{,}0 \times 10^9$	45	0
Saccharose	$0{,}5 \times 10^9$	0	5
Arabinose	$1{,}5 \times 10^9$	0	12
Glycerin	$2{,}5 \times 10^9$	0	17

Die Glucose scheint nach diesen Ergebnissen den Try-Abbau durch die Try-ase weitgehend zu verhindern. Es wurde deshalb getestet, inwieweit die Stämme all_1 und T_1 bei verschiedenen Glucose-Konzentrationen im Minimalmedium das Try abbauen

können. Dazu wurden dem Kulturmedium nach dem Animpfen 150 mg/l Try zugesetzt und nach 40 Std. Inkubation das Indol und das Try im Medium bestimmt. Die Ergebnisse in Abb. 4 zeigen deutlich, daß bei dem Stamm all_1 der Try-Abbau auch durch hohe Glucose-Konzentrationen nur sehr begrenzt reduziert werden konnte; selbst bei 40 g/l Glucose wurden noch 50 % des zugesetzten Try gespalten. Bei dem Stamm T_1 dagegen reichten 30 g/l Glucose aus, um den Try-Abbau völlig zu verhindern. Mit Hilfe einer Mutation, die zu einer starken Herabsetzung der Tryptophanase-Aktivität geführt hatte, und der katabolischen Repression durch die Glucose im Medium konnte somit der Try-Abbau des Stammes all_1 bzw. T_1 verhindert werden.

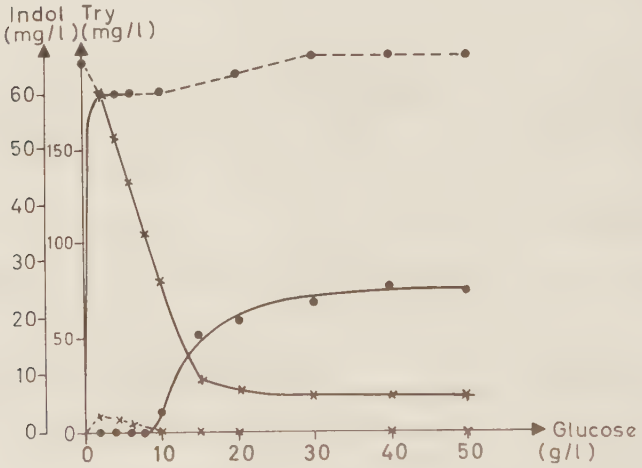

Abb. 4: Try- (•) und Indol- (×) Konzentrationen im Kulturmedium der Stämme all_1 (—) und T_1 (--) in Abhängigkeit von der zugesetzten Glucosemenge. Das Medium enthielt vor dem Animpfen 150 mg/l Try; die Bestimmung des Try und Indols erfolgte nach 40 Std. Inkubation der Kulturen.

Eine Untersuchung der Mutanten T_1, T_2 und T_3 auf Try-Ausscheidung ergab, daß auch durch diese genetische Veränderung keine wesentliche Steigerung der Try-Produktion erreicht werden konnte. Der Stamm T_1 schied 55 mg/l Try aus, die Stämme T_2 50 mg/l und T_3 48 mg/l. Da bei der Aminosäure-Fermentation häufig durch Variation der N-Quelle im Medium eine Produktionssteigerung erfolgte, wurde versucht, die Try-Ausscheidung des Stammes T_1 durch andere N-Quellen als $(NH_4)_2SO_4$ im Minimalmedium zu erhöhen. Doch wie aus der Abb. 5 zu ersehen ist, wurde durch Zugabe von Harnstoff zum Minimalmedium das Wachstum und entsprechend die Try-Bildung gehemmt. TAMIR und SRINIVASON, 1969 fanden, daß Harnstoff die Anthranilat-synthetase hemmt, wenn nicht Glutamin, sondern NH_4^+ als NH_2-Donator dient. Doch auch andere organische N-Quellen wie Asp, Gly oder

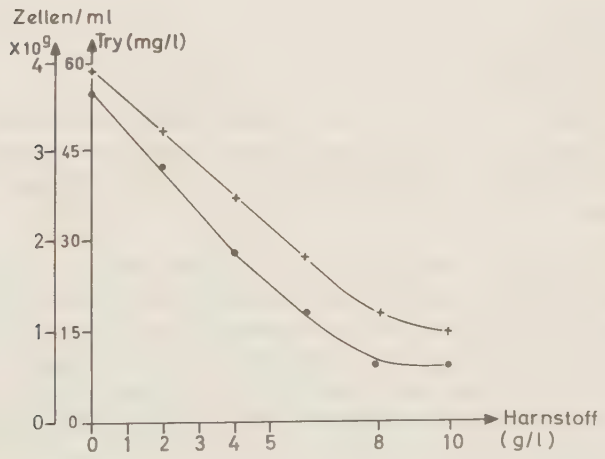

Abb. 5: Try-Ausscheidung (•) und Wachstum (+) des Stammes T_1 in Abhängigkeit von der Harnstoff-Konzentration im Minimalmedium

Pepton im Kulturmedium führten zu keiner Steigerung der Try-Ausscheidung bei dem Stamm T_1. Da ITO et al., 1969 nachweisen konnten, daß NH_4^+-Ionen die Anthranilat-synthetase aktivieren, wurden für die weiteren Versuche als N-Quelle $(NH_4)_2SO_4$ dem Minimalmedium zugesetzt. Außerdem konnte gezeigt werden, daß 50 g/l Glucose als C-Quelle im Minimalmedium optimal sind sowohl für das Wachstum als auch für die Try-Produktion und die katabolische Repression der Tryptophanase des Stammes T_1. Da die Enzyme der Try-Biosynthese durch Glucose nicht reprimiert werden (DeCROMBRUGGHE et al., 1969), konnte bei den weiteren Versuchen dem Minimalmedium jeweils 50 g/l Glucose zugesetzt werden, wenn die E. coli-Stämme auf Try-Ausscheidung untersucht wurden.

5. Veränderungen der Zellpermeabilität

Neben der Regulation der Biosynthese-Enzyme spielt die Permeabilität der Zelle eine wichtige Rolle bei der Bildung mikrobieller Produkte. So produziert der Stamm Micrococcus glutamicus nur dann sehr viel Glu, wenn durch die Kulturbedingungen die Permeabilität für diese Aminosäure sehr groß ist (DEMAIN und BIRNBAUM, 1968). Es wurde deshalb versucht, die Try-Ausscheidung des in der Aromatenbiosynthese deregulierten und teilweise Tryptophanase$^-$-Stammes T_1 durch Veränderung der Zellpermeabilität zu steigern.

Zu diesem Zweck wurden dem Minimalmedium Biotin, das den Fettsäuregehalt der Zellwand beeinflußt (GAVIN und UMBREIT, 1965), Penicillin, das die terminale Reaktion der Zellwandsynthese hemmt (TIPPER und STROMINGER, 1965) oder Detergenzien, die die Permeabilität erhöhen (TAKINAMI et al., 1964), zugesetzt. Die Try-Ausscheidung des Stammes T_1 nach 65 Std. Inkubation bei diesen verschiedenen Zusätzen ist in der folgenden Tabelle 10 aufgeführt.

Durch die Zugabe von 10 mg/l Penicillin-G zum Medium konnte die Try-Produktion um 18 % gesteigert werden, während durch die übrigen Substanzen keine wesentlichen Veränderungen der

Tabelle 10: Tryptophanbildung des Stammes T_1 bei Zusatz von Substanzen zum Kulturmedium, die die Zellpermeabilität beeinflussen

Zusätze (mg/l)	Try-Ausscheidung (mg/l)
-	55
0,01 Biotin	57
0,02 Biotin	60
0,05 Biotin	58
0,1 Biotin	60
10 Penicillin	65
50 Penicillin	40
5×10^3 Tween 40	54
10^4 Tween 40	50
5×10^3 Tween 60	55
10^4 Tween 60	40

Try-Bildung des Stammes T_1 erfolgten. Tween 60 scheint in höheren Konzentrationen die Try-Ausscheidung jedoch teilweise zu hemmen. Da das Penicillin nur auf wachsende Zellen wirkt, wurde dies und auch die Detergenzien erst nach dem Animpfen zu verschiedenen Zeiten (3 Std. und 6 Std.) der Kultur zugegeben, doch auch dadurch konnte keine wesentliche Veränderung der Try-Produktion erreicht werden.

Es sind zwei Gründe dafür denkbar, weshalb eine Erhöhung der Zellpermeabilität keine wesentliche Steigerung der Try-Ausscheidung zur Folge hatte: Entweder kann der Stamm T_1 nicht wesentlich mehr Try synthetisieren als 60 mg/l oder die Try-Ausscheidung kann nur aktiv erfolgen. BOEZI und DeMOSS, 1961 beschrieben für E. coli ein Try-Transportsystem, während PIPERNO und OXENDER, 1968 eine Permease für die drei aromatischen Aminosäuren Phe, Try und Tyr fanden. Um nun zu prüfen, welcher der beiden möglichen Gründe für die begrenzte Try-Produktion zutrifft, wurde versucht, Mutanten vom Stamm T_1 zu isolieren, die einen Defekt in der Permease der aromatischen Aminosäuren haben. Eine einfache Selektionsmethode für

solche Mutanten besteht darin, daß man Azaserin-Resistente isoliert. Das Antibiotikum Azaserin wird durch diese Permease der aromatischen Aminosäuren in die Zelle transportiert (BROCK und BROCK, 1961). Die Resistenz gegen Azaserin kann nun darauf beruhen, daß diese Permease durch eine Mutation im dazugehörigen Strukturgen inaktiv geworden ist und dann das Antibiotikum nicht mehr in die Zelle gelangt. Vom Stamm T_1 wurde eine Azaserin-resistente Mutante gewonnen, die nicht wie T_1 55 mg/l, sondern nur 10 mg/l Try ins Medium ausschied. Durch Zugabe von 10 mg/l Penicillin-G zum Kulturmedium konnte die Try-Produktion dieser Azaserin-resistenten Mutante auf 35 mg/l erhöht werden. Dies ist ein Hinweis dafür, daß der aktive Transport dieser Aminosäure eine wichtige Rolle bei der Ausscheidung spielt, daß aber durch die Veränderung der Zellpermeabilität durch Penicillin diese Permease-Funktion bei der Try-Ausscheidung weitgehend umgangen werden kann. Es ist somit ziemlich sicher, daß der begrenzende Faktor für die Try-Produktion des Stammes T_1 nicht der aktive Transport ist, da der Zusatz von Penicillin die Try-Ausscheidung nur um 18 % steigerte, sondern die Syntheserate der Try-Biosynthese selbst.

6. Isolierung Threonin- und Leucin-prototropher Mutanten

Alle bisher beschriebenen Mutanten dieser Arbeit sind wie der Ausgangsstamm P 678 auxotroph für Leu und Thr. Zu Beginn dieser Untersuchungen wurde ein solcher E. coli K 12-Stamm gewählt, um gegebenenfalls bei den verschiedenen Mutanten Genkartierungen ausführen und um den Stamm leichter identifizieren zu können. Da es für die weiteren Untersuchungen und für eine Züchtung in großem Maßstabe jedoch unzweckmäßig und zu teuer wäre, einen Stamm zu verwenden, der Thr und Leu benötigt, wurden,ausgehend vom Stamm T_1, Mutanten isoliert, die für diese beiden Aminosäuren prototroph sind.

Es wurden zunächst 8 spontane Revertanten von T_1 selektioniert, die kein Thr,wohl aber noch Leu zum Wachstum auf Mini-

malmedium benötigten; sie wurden mit LA bezeichnet. Die Try-Bildung dieser 8 Thr^+-Revertanten lag zwischen 40 und 60 mg/l. Vom Stamm mit der höchsten Try-Ausscheidung LA_8 konnten nach Mutagenbehandlung mit MNG 10 Leu-prototrophe Mutanten, P_1 bis P_{10} genannt, isoliert werden. Diese Stämme zeigten in Minimalmedium ohne irgendwelche Zusätze - die Auxotrophie für Vitamin B_1 besaß der Stamm auch nicht mehr - sehr gutes Wachstum, doch überraschenderweise betrug die Try-Produktion nur noch 10 bis 25 mg/l. Es wurde versucht, den Grund für diese starke Abnahme der Try-Bildung zu finden. Wie die folgende Tabelle 11 zeigt, gelang es durch Erhöhung der N-Konzentration im Medium, die Try-Ausscheidung des Stammes P_{10} wieder auf 50 mg/l zu steigern.

Tabelle 11: Tryptophan-Produktion des Stammes P_{10} bei verschiedenen N-Konzentrationen des Minimalmediums

Zusätze zum Minimalmedium (g/l)	Wachstum (Zellzahl/ml)	Try-Ausscheidung (mg/l)
-	$4{,}5 \times 10^9$	25
10 $(NH_4)_2SO_4$	$5{,}5 \times 10^9$	50
20 $(NH_4)_2SO_4$	$5{,}5 \times 10^9$	48
30 $(NH_4)_2SO_4$	$5{,}0 \times 10^9$	40
40 $(NH_4)_2SO_4$	$4{,}5 \times 10^9$	35
50 $(NH_4)_2SO_4$	$2{,}0 \times 10^9$	10
10 NH_4NO_3	$5{,}5 \times 10^9$	35
20 NH_4NO_3	$5{,}0 \times 10^9$	48
30 NH_4NO_3	$0{,}5 \times 10^9$	5

Da die Zugabe von 10 g/l $(NH_4)_2SO_4$ zum Minimalmedium bei dem Stamm P_{10} zu der höchsten Try-Ausscheidung führte, wurde diese Menge bei den weiteren Versuchen auf Try-Bildung zusätzlich zu den 50 g/l Glucose dem Kulturmedium zugesetzt.

7. Versuche zur Partialsynthese von Try aus Indol

a) Indolumwandlung durch Stämme, die haploid sind für die Gene des Try-Operons

Obwohl bei dem Stamm P_{10} alle bekannten Regulationsmechanismen der Try-Biosynthese durch Mutationen ausgeschaltet wurden, der Try-Abbau durch Mutation und katabolische Repression beseitigt und die Permeabilität durch Penicillin oder Detergenzien erhöht wurde, gelang es nicht, die Try-Produktion dieses Stammes wesentlich über 50 mg/l zu steigern. Durch Zugabe von Intermediärprodukten der Try-Biosynthese zum Kulturmedium wurde deshalb versucht, zu ermitteln, welche Schritte des Try-Biosyntheseweges noch begrenzend sind für eine höhere Try-Ausscheidung.

Zunächst wurde das letzte Zwischenprodukt der Try-Biosynthese, Indol, in verschiedenen Konzentrationen dem Medium zugegeben.

Tabelle 12: Wachstum, Indolverwertung und Tryptophan-Bildung des Stammes P_{10} bei verschiedenen Mengen Indol im Medium nach 65 Std. Inkubation

Zugesetztes Indol (mg/l)	Wachstum (Zellzahl/ml)	Indol	Try-Menge (mg/l)
-	$5{,}5 \times 10^9$	-	50
50	$5{,}0 \times 10^9$	-	100
100	$3{,}8 \times 10^9$	+	150
150	$1{,}0 \times 10^9$	+	60
200	0	+	0

Wie aus dieser Tabelle zu ersehen ist, konnten 50 mg/l Indol vom Stamm P_{10} quantitativ zu Try umgesetzt werden, während bei Zugabe größerer Indolmengen nach 65 Std. Inkubation noch ein Teil davon im Medium vorhanden war. Außerdem wirkten Indolkonzentrationen über 100 mg/l sehr stark wachstumshemmend auf den E. coli-Stamm. Um nun untersuchen zu können, ob die bakteriostatische Wirkung des Indols der Grund für die geringe

Umsatzrate des Indols zu Try ist oder ob andere Faktoren eine Rolle spielen, wurden einige Mutanten von P_{10} isoliert, die gegen 2 mM Indol resistent sind. Diese Stämme Ind produzierten ohne Zusätze nicht wesentlich mehr Try als der Stamm P_{10}, nämlich 50 bis 60 mg/l. Der Stamm Ind_2 mit der höchsten Try-Produktion wurde bei Zugabe von Indol, DL-Serin und Glycin zum Medium auf Try-Ausscheidung untersucht.

Tabelle 13: Tryptophan-Bildung des Stammes Ind_2 bei Zusatz von Indol, DL-Serin und Glycin zum Minimalmedium

Zusätze (mg/l)	Indol	Try-Ausscheidung (mg/l)
-	-	60
100 Indol	+	150
150 Indol	+	180
200 Indol	+	200
300 Indol	+	80
200 Indol + 500 DL-Serin	-	480
200 Indol + 500 Glycin	+	250
500 Glycin	-	62
500 DL-Serin	-	70

Der Indol-resistenten Mutante Ind_2 konnte mehr Indol zugegeben werden als dem Stamm P_{10}, ohne daß dadurch das Wachstum gehemmt wurde, was zu einer entsprechend höheren Try-Bildung führte. Jedoch konnten größere Mengen Indol nur dann vollständig zu Try umgewandelt werden, wenn dem Medium neben Indol noch DL-Serin zugegeben wurde. Dies ist ein erster Hinweis dafür, daß außer dem Indol auch das zweite Substrat der Tryptophan-synthetase, das L-Serin, für die Try-Synthese einen begrenzenden Faktor darstellt.

Die geringe Try-Ausscheidung des Stammes P_{10} ist nach diesen Befunden in erster Linie dadurch bedingt, daß zu wenig Indol

in der Zelle synthetisiert wird und daß außerdem nur eine sehr begrenzte Menge L-Serin für die Try-Biosynthese zur Verfügung steht. Das Enzym für den letzten Reaktionsschritt der Try-Biosynthese, die Tryptophan-synthetase, scheint dagegen völlig dereguliert zu sein. So konnte die Try-Produktion von Ind_2 auf 700 mg/l gesteigert werden, wenn man den Stamm in Minimalmedium pH-statisch (pH = 7,0) 24 Std. vorkultivierte und dann 3 g/l Indol und 6 g/l DL-Serin zugab, nachdem der pH des Mediums auf 7,8 eingestellt worden war. Es wurde dieser pH-Wert gewählt, da in diesem Bereich das pH-Optimum der Try-synthetase liegt (YANOFSKY, 1960). Doch scheint bei Zugabe großer Mengen von Indol und DL-Serin die Try-synthetase bei der Try-Bildung begrenzend zu wirken, da nun nicht alles Indol zu Try umgesetzt wurde. Es wurde deshalb versucht, Stämme mit einer höheren spezifischen Try-synthetase-Aktivität zu gewinnen.

b) Isolierung von Stämmen, die heterogenot diploid sind für die Gene des Try-Operons

CIFERRI et al., 1969 konnten bei Saccharomyces cerevisiae zeigen, daß die Try-synthetase-Aktivität streng linear proportional zur Anzahl der Gene für dieses Enzym ist. Vom Stamm Ind_2 wurden deshalb Bakterien isoliert, die diploid für die Gene der Try-Biosynthese-Enzyme sind.

Um solche Stämme zu erhalten, wurde eine Sexduktion mit dem Stamm YS-57/F', der unter anderem die gesamten Gene des Try-Operons und das Cys B^+-Gen auf dem Episom trägt, und dem Stamm Ind_2, der F^- ist, ausgeführt. Damit die für das Try-Operon diploiden Stämme nach der Sexduktion selektioniert werden konnten (siehe Seite 16), wurden zunächst vom Stamm Ind_2 10 Cys-auxotrophe Mutanten isoliert. Nach der Sexduktion mit YS-57/F' konnten nur 5 dieser Cys-auxotrophen Rezipienten-Stämme IC eine große Anzahl Kolonien auf Minimalmedium ohne Cys-Zusatz bilden. Von jedem dieser IC-Stämme wurden 3 prototrophe Kolonien isoliert und davon durch einen Verdün-

nungsausstrich Einzelkolonien gewonnen. Diese vermutlich heterogenot diploiden Stämme wurden dann mittels des f_r-Phagen-Tests auf den Besitz eines Episoms bzw. eines F-Faktors untersucht. Nur einer dieser 15 Stämme, S_3, war nach diesem Test F^+, alle anderen ermöglichten dem f_r-Phagen keine Vermehrung. Vermutlich hatten diese Stämme bei der Sexduktion nur einen Teil des relativ großen Episoms erhalten, der das Cys B^+-Gen, aber nicht den F-Faktor trug. Dieser Teil des Episoms wurde dann in das Bakterienchromosom des Rezipienten-Stammes eingebaut, was dazu führte, daß dieser Stamm wieder Cys-prototroph wurde. Wie Kontrollversuche zeigten, erfolgte die Rückmutation bei den IC-Stämmen von Cys^- zu Cys^+ nur mit einer Häufigkeit von 10^{-7} bis 10^{-8}. Dies kann folglich nicht der Grund dafür sein, daß unter den Cys-prototrophen Stämmen nach der Sexduktion so wenig F^+-Stämme gefunden wurden.

Die zweite Testmöglichkeit auf Episomen, die Acridinorange-Behandlung, konnte in diesem Fall nicht angewandt werden, da das Episom neben den Try-Genen und einigen anderen noch den colizinogenen Faktor, Col B, trägt. Nach FREDERICO, 1969 können aber Episomen, die den Col B-Faktor tragen, nicht durch Acridinorange an ihrer Replikation gehemmt werden; vermutlich kann der Farbstoff nicht in solche Zellen eindringen.

c) Try-Produktion des heterogenot diploiden Stammes S_3

Der Stamm S_3 schied nach 65 Std. Inkubation in Minimalmedium keine nachweisbaren Mengen Try mehr aus, obwohl der Rezipienten-Stamm IC_3, aus dem S_3 durch Sexduktion mit YS-57/F' hervorging, noch 24 mg/l Try produzierte. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, daß zwischen den deregulierten Enzymen der chromosomalen Gene des Try-Operons und den noch voll regulierbaren Enzymen der episomalen Try-Gene Komplementation erfolgt ist. Eine intercistronale Komplementation kann z.B. dazu führen, daß die Anthranilat-synthetase, die aus zwei verschiedenen Polypeptidketten aufgebaut ist (ITO und YANOFSKY, 1969), wieder weitgehend durch Try gehemmt werden kann. Außerdem lie-

fert dieses Ergebnis einen Hinweis dafür, welche Mutation im Stamm FMT_1 zur Derepression der Try-Biosynthese-Enzyme geführt hat. Da das Try-Operon auf dem Episom in Anwesenheit von Try nur dann transkribiert werden kann, wenn kein aktiver Aporepressor vorhanden ist, muß das Repressorgen Try R^+ des Stammes MT_5 in dem dereprimierten Stamm FMT_1 zu Try R^- mutiert sein. Eine Mutation im Operator des Try-Operons ist nämlich nicht trans-, sondern nur cis-dominant.

Der Stamm S_3 wurde nun auf Try-Bildung durch Indolumwandlung untersucht. Man zog den Stamm S_3 20 Std. pH-statisch (pH 7,0) in Minimalmedium an, stellte den pH danach auf 7,8 ein und gab 3 g/l Indol und 6 g/l DL-Serin zu. Nach weiteren 24 Std. Inkubation wurde dann der Try-Gehalt des Kulturmediums bestimmt.

Tabelle 14: Try-Bildung der Stämme S_3, Ind_2, YS-57/F' und W 1485 nach Zugabe von 3 g/l Indol und 6 g/l DL-Serin zu den 20 Std. alten Kulturen

Stamm	Try-Produktion (mg/l)
S_3	2 000
Ind_2	700
YS-57/F'	100
W 1485	100

Wie diese Tabelle zeigt, produzierte der heterogenot diploide Stamm S_3 dreimal mehr Try aus den Vorstufen Indol und DL-Serin als der haploide Stamm Ind_2. Diese Steigerung der Try-Ausscheidung um den Faktor 3, anstatt - wie erwartet - um den Faktor 2, kann mit Hilfe der Befunde von YURA et al., 1968 erklärt werden. Sie konnten zeigen, daß E. coli-Zellen, die ein Episom mit einem Try-Operon haben, dreimal mehr Try-Gene besitzen als der haploide Stamm, da sich das Episom immer in der frühen Phase des Zellzyklus repliziert. Außerdem beweist die Erhöhung der Try-Bildung bei dem Stamm S_3, daß die Gene

des Try-Operons auf dem Episom tatsächlich abgelesen werden, was nur dann möglich ist, wenn der Rezipienten-Stamm IC_3 Try R^- war. Die hohe Try-Produktion der beiden in der Try-Biosynthese nicht deregulierten Stämme YS-57/F' und W 1485 aus Indol und DL-Serin beruht darauf, daß die Tryptophan-synthetase, die diese Umwandlung katalysiert, in E. coli nur einer Endprodukt-Repression unterliegt. FREUNDLICH und LICHSTEIN, 1962 fanden aber, daß die Tryptophan-synthetase nicht völlig reprimiert werden kann; der Grund hierfür ist nach MORSE und YANOFSKY, 1968 der, daß die letzten 3 Enzyme der Try-Biosynthese auch bei völliger Repression der ersten beiden Enzyme mit geringer Syntheserate konstitutiv gebildet werden können.

d) Isolierung von Stämmen, die zwei deregulierte Try-Operons besitzen

Um zu prüfen, weshalb der Stamm S_3 kein Try mehr ins Medium ausscheidet, wenn man dem Minimalmedium kein Indol und DL-Serin zusetzt, wurde versucht, Stämme zu selektionieren, bei denen nicht nur die Enzyme des chromosomalen, sondern auch des episomalen Try-Operons dereguliert sind. Zu diesem Zweck wurden zunächst vom Stamm YS-57/F' Mutanten gewonnen, die resistent sind gegen 10^{-3} M 5-MT und gegen 10^{-3} M 5-FT. Wie ein f_r-Phagen-Test zeigte, besaßen diese Mutanten YFM noch das Episom. Außerdem schieden die Stämme YFM 8 bis 15 mg/l Try ins Kulturmedium aus, was ein Beweis dafür ist, daß die Enzyme der Try-Biosynthese dereguliert sind. Da der Stamm YS-57/F' auf dem Chromosom keine Strukturgene des Try-Operons mehr besitzt, sondern nur noch das vollständige Try-Operon auf dem Episom hat, sind bei den Stämmen YFM diese Gene so mutiert, daß die entsprechenden Enzyme keiner Feedback-Hemmung mehr durch Try unterliegen. Es wurden nun Sexduktionen mit dem Rezipienten-Stamm IC_3 und den Donor-Stämmen YFM ausgeführt. Auf diese Weise gelang es, 3 verschiedene, für das Try-Operon heterogenot diploide Stämme A_1, A_2 und A_3 zu isolieren, die in den gesamten Try-Biosynthese-Enzymen dereguliert sind. Diese Stämme wurden auf Try-Bildung und Indolumwandlung untersucht.

Tabelle 15: Try-Produktion der Stämme S_3, A_1, A_2 und A_3 in Minimalmedium mit und ohne Zusatz von 3 g/l Indol und 6 g/l DL-Serin. Die Zugabe der beiden Substanzen erfolgte nach 20 Std. Vorinkubation bei pH 7,0

Stamm	Zusätze (g/l)	Indol	Try-Ausscheidung (mg/l)
S_3	-	-	0
A_1	-	-	40
A_2	-	-	50
A_3	-	-	75
S_3	3 Indol + 6 DL-Serin	+	2 000
A_1	3 Indol + 6 DL-Serin	+	2 100
A_2	3 Indol + 6 DL-Serin	+	1 800
A_3	3 Indol + 6 DL-Serin	+	1 500

Wie aus dieser Tabelle 15 zu ersehen ist, ist der Grund dafür, daß S_3 ohne Vorstufengabe kein Try mehr ausscheidet, sehr wahrscheinlich der, daß durch intercistronale Komplementation der "Feedback-resistenten" und der "Feedback-sensitiven" Proteine der Anthranilat-synthetase dieses Enzym im Stamm S_3 durch Try weitgehend gehemmt werden kann. Die Stämme A_1, A_2 und A_3, die keine Wildtyp-Gene mehr haben, schieden dagegen wieder etwa ebensoviel Try aus wie die haploiden deregulierten Stämme. Dies ist ein Hinweis dafür, daß einerseits in diesen Stämmen die Anthranilat-synthetase keiner Endprodukt-Hemmung durch Try mehr unterliegt und daß andererseits keine Steigerung der Try-Produktion durch Erhöhung der Enzymmenge für die Try-Biosynthese möglich ist. Wie zu erwarten war, produzierten die Stämme A_1, A_2 und A_3 bei Zugabe von Indol und DL-Serin nach 20 Std. Anzucht in Minimalmedium bei pH 7,0 nicht wesentlich mehr Try als der Stamm S_3.

e) Optimierung der Try-Produktion des Stammes A_1 aus Indol und DL-Serin

Durch Variation der Kulturbedingungen wurde versucht, die Try-Ausscheidung des Stammes A_1 bei Zugabe von Indol und DL-Serin zu steigern. Zunächst wurde die Try-Bildung bei Zusatz von 200 mg/l Indol und 400 mg/l DL-Serin bzw. 400 mg/l Glycin entweder zum Minimalmedium oder zum Komplettmedium in Abhängigkeit vom Alter der Submerskultur ermittelt. Der pH-Wert des Mediums wurde jeweils vor Zugabe dieser Substanzen mit 1 n HCl oder 1 n NaOH auf 7,8 eingestellt. Das Versuchsergebnis ist in der Abb. 6 dargestellt. Die maximale Try-Ausschei-

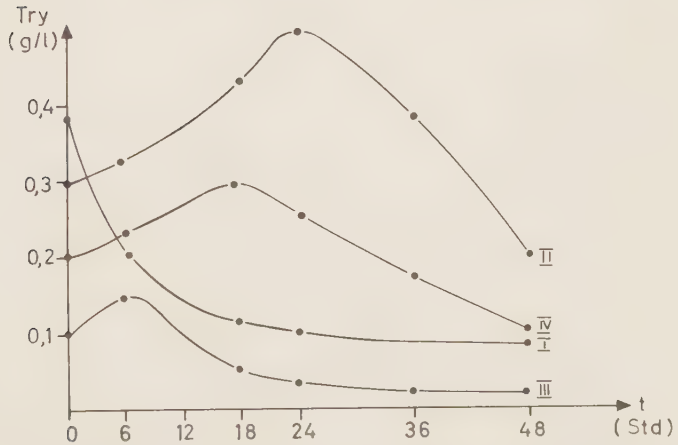

Abb. 6: Abhängigkeit der Try-Bildung des Stammes A_1 aus Indol und DL-Serin bzw. Glycin vom Alter der Kultur

I Minimalmedium + 200 mg/l Indol + 400 mg/l DL-Serin
II Komplettmedium +200 mg/l Indol + 400 mg/l DL-Serin
III Minimalmedium + 200 mg/l Indol + 400 mg/l Glycin
IV Komplettmedium +200 mg/l Indol + 400 mg/l Glycin

dung erfolgte dann, wenn der Stamm A_1 24 Std. in Komplettmedium vorgezüchtet worden war, bevor das Indol und DL-Serin zugegeben wurde. Im Minimalmedium war die Try-Bildung dagegen unter gleichen Bedingungen nur noch sehr gering. Ein Grund dafür scheint das starke Absinken des pH-Wertes in diesem Medium während des Wachstums zu sein (Abb. 7). Wurde nämlich die Kultur in Minimalmedium pH-statisch (pH 7,0) angezogen und dann nach 24 Std. das Indol und DL-Serin zugesetzt, so betrug die Try-Bildung wie im Komplettmedium 500 mg/l. Es könnte sein, daß die Tryptophan-synthetase in saurem Bereich instabil ist. Daher wurde versucht, das Absinken des pH-Wertes im Medium während des Wachstums durch $CaCO_3$-Zusatz zu verhindern. Es zeigte sich jedoch, daß dieses das Wachstum von

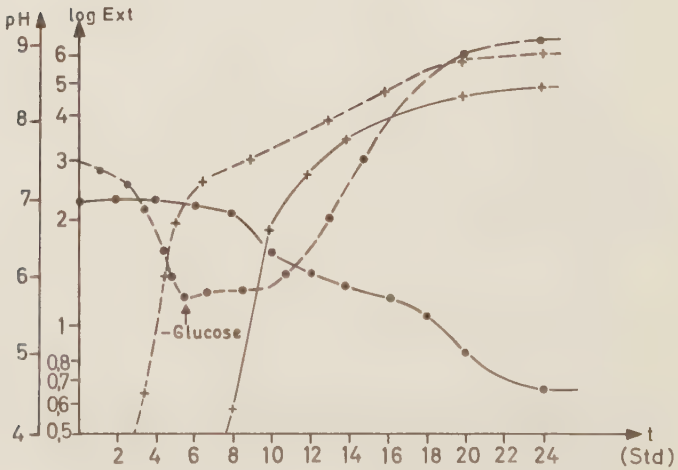

Abb. 7: Abhängigkeit des Wachstums (+) und des pH-Wertes (•) von der Inkubationsdauer des Stammes A_1 in Komplett- (---) oder Minimal- (——) Medium

Stamm A_1 hemmt. Die Säurebildung während des Wachstums konnte auch durch Veränderung der C-Quelle nicht ausreichend verhindert werden. Wurde anstatt DL-Serin Glycin zugesetzt, so war die Try-Produktion wesentlich geringer, und der optimale Zeitpunkt für die Zugabe von Indol und Glycin zum Komplettmedium lag 6 Std. früher. Die Try-Bildung des Stammes A_1 aus Indol konnte durch Glycinzugabe zwar nicht so stark gesteigert werden wie bei DL-Serinzusatz, aber sie war höher als bei den Kulturen, die nur Indol bekamen. Ein Teil des Glycins scheint somit zu L-Serin umgewandelt worden zu sein; PIZER und POTOCHNY, 1964 konnten zeigen, daß Serin-auxotrophe Mutanten von E. coli auch mit Glycin wachsen können. Durch eine kontinuierliche Zugabe von Indol und Glycin zum Minimalmedium gelang es, die Try-Ausscheidung des Stammes A_1 auf 700 mg/l zu steigern.

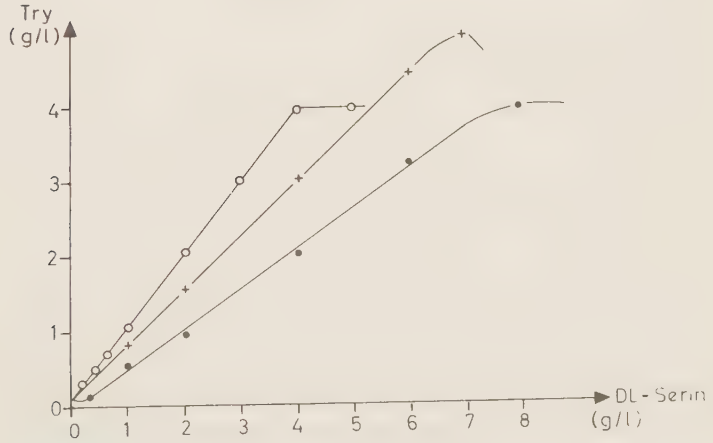

Abb. 8: Abhängigkeit der Try-Produktion des Stammes A_1 aus Indol von der DL-Serinkonzentration im Medium bei 1 g/l (o), 1,5 g/l (+) und 2 g/l (•) Indolzusatz

Im folgenden wurde nun ermittelt, welche Mengen an Indol und DL-Serin maximal zu Try umgesetzt werden können und welches Verhältnis von Indol : DL-Serin dafür optimal ist. Der Stamm A_1 wurde 24 Std. in Komplettmedium angezogen, dann wurde der pH-Wert der Kultur durch Zugabe von 1 n HCl auf 7,8 eingestellt und die beiden Substanzen zugegeben. Nach weiteren 24 Std. Inkubation wurde das Try und das Indol im Medium bestimmt. Die ermittelten Try-Werte sind in Abhängigkeit von der DL-Serinkonzentration in Abb. 8 aufgetragen.

Eine maximale Try-Ausscheidung - 5 g/l - wurde bei Zugabe von 1,5 g/l Indol und 7 g/l DL-Serin erreicht.

Wie aus Abb. 8 zu ersehen ist, ist das Verhältnis von Indol : DL-Serin im Medium für die Try-Bildung sehr entscheidend

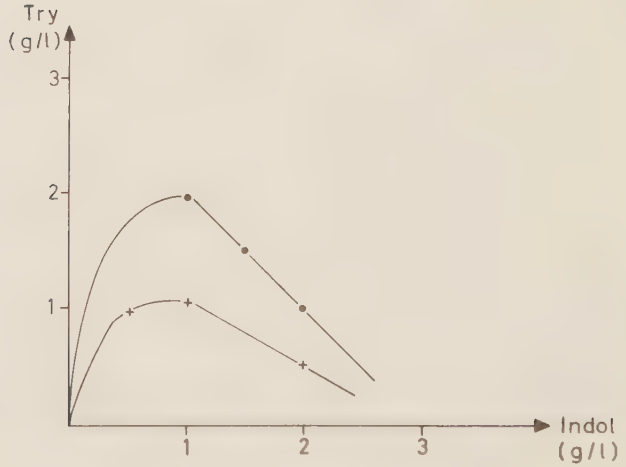

Abb. 9: Try-Bildung des Stammes A_1 bei Zugabe von 1 g/l (+) oder 2 g/l (•) DL-Serin in Abhängigkeit von der zugesetzten Indolmenge

und etwa bei 1 : 4 optimal in bezug auf die Try-Bildung. Wurde weniger DL-Serin als die 4-fache Indol-Konzentration zugegeben, so trat, wie Abb. 9 zeigt, eine Abnahme der Try-Produktion ein.

Das Verhältnis der Molekulargewichte von Indol : Serin : Try beträgt 105 : 117 : 204, also etwa 1 : 1 : 2. Da im DL-Serin etwa 50 % L-Serin enthalten sind - denn nur dieses ist unmittelbar für die Try-Biosynthese verwertbar -, wäre das optimale Mischungsverhältnis für die Try-Synthese Indol : DL-Serin = 1 : 2 und nicht, wie experimentell ermittelt, 1 : 4. Um den Grund für diesen großen Unterschied zu ermitteln, wurde zunächst die Try-Produktion bei Zugabe von Indol und L-Serin unter den obigen Kulturbedingungen untersucht.

Tabelle 16: Try-Ausscheidung des Stammes A_1 bei Zugabe von Indol und L-Serin zu einer 24 Std. alten Kultur in Komplettmedium

Zusätze		
Indol (g/l)	L-Serin (g/l)	Ausgeschiedenes Try 24 Std. nach Zugabe der Zusätze (g/l)
0,5	0,5	1,0
1,0	1,0	2,1
2,0	2,0	1,9
1,0	2,0	4,0

Wie diese Tabelle zeigt, ist bei der Zugabe von L-Serin nur die halbe Menge nötig, um die gleiche Try-Ausscheidung zu erreichen wie bei Zusatz von DL-Serin. Der Stamm A_1 scheint somit das D-Serin unter diesen Bedingungen nicht durch eine Racemase in L-Serin umzuwandeln. Außerdem weist das Ergebnis der letzten Zeile der Tabelle 16 darauf hin, daß der Stamm A_1 einen Teil des Indols, das zu Try umgesetzt wird, selbst synthetisiert. Es wurde deshalb im folgenden die Indolumsetzung und die Try-Bildung näher untersucht.

Wie in den vorhergegangenen Versuchen wurde der Stamm A_1 24 Std. in Komplettmedium vorgezüchtet und dann nach Einstellen des pH-Wertes im Medium auf 7,8 Indol und/oder DL-Serin zugegeben. Nach weiteren 4 bzw. 24 Std. Inkubation wurde die Indol- und Try-Konzentration im Kulturmedium ermittelt. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 17 zusammengefaßt; sie liefern einen weiteren Beweis dafür, daß der Stamm A_1 etwa 1 g/l Indol selbst synthetisieren kann. Überraschend dabei ist, daß die Indolbildung anscheinend durch Indol induziert wird, denn ohne Indolzugabe kommt es unter den beschriebenen Kulturbedingungen zu keiner nachweisbaren Indol-Ausscheidung.

Tabelle 17: Indolumsetzung und Try-Produktion des Stammes A_1 bei Zugabe von Indol und DL-Serin nach 24 Std. Anzucht in Komplettmedium

Zusätze		4 Std. nach Zugabe der Zusätze		24 Std. nach Zugabe der Zusätze	
Indol (g/l)	DL-Serin (g/l)	Indol (g/l)	Try (g/l)	Indol (g/l)	Try (g/l)
-	-	0,04	0,1	0,04	0,1
1	-	1,6	0,2	2,0	0,2
-	2	0,05	0,1	0,05	0,1
-	4	0,04	0,1	0,04	0,1
1	2	0,95	0,9	0,3	2,0
1	3	0,96	1,1	0,1	2,9
1	4	0,87	1,2	0	4,0
1	6	0,9	1,5	0	4,0
1,5	4	1,5	1,1	0,4	3,9
1,5	6	1,5	1,3	0	4,5
1,5	8	1,5	1,3	0	4,2
2	8	2,0	1,1	0,7	4,3

LIM und MATELES, 1964 isolierten eine Mutante von E. coli, die neben 50 mg/l Try noch 350 mg/l Indol ins Medium ausschied. Da der Stamm A_1 die 3-fache Menge an Enzymen der

Try-Biosynthese im Vergleich zu dieser Mutante besitzt, ist auch eine um den Faktor 3 höhere Indol-Ausscheidung bei A_1 zu erwarten, wenn beide Stämme gleich dereguliert sind. Diese Berechnung stimmt erstaunlich gut mit den experimentellen Daten überein. Die Synthese von 1 g/l Indol bei dem Stamm A_1 spricht sehr dafür, daß dessen Try-Biosynthesekette völlig dereguliert ist. Da aber zu wenig L-Serin in der Zelle gebildet wird, um diese große Menge Indol zu Try umzuwandeln, scheidet der Stamm nicht Try, scndern Indol aus. Bei Zugabe von Indol und L- bzw. DL-Serin wird somit einerseits die Indol-Biosynthese induziert und andererseits die Try-Bildung aus diesen Zwischenprodukten der Try-Biosynthese mit Hilfe der Tryptophan-synthetase sehr stark gesteigert. Die Try-synthetase, die die physiologische Aufgabe in der Zelle hat, Try aus InGP und L-Serin zu bilden (YANOFSKY, 1960), kann die beiden Teilreaktionen

$$\text{InGP} \longrightarrow \text{Indol} + \text{Glycerinaldehyd-3-phosphat}$$
$$\text{Indol} + \text{L-Serin} \longrightarrow \text{Try}$$

auch getrennt und unabhängig voneinander ausführen. Da der Stamm A_1 wohl in der Lage ist, bei den entsprechenden Kulturbedingungen selbst etwa 1 g/l Indol zu synthetisieren, aber nicht die entsprechende Menge L-Serin für die Try-Biosynthese selbst bilden kann, muß für die Transformation von Indol zu Try entsprechend mehr L-Serin dem Kulturmedium zugesetzt werden. Dies ist folglich der Grund für die Abweichung des experimentell bestimmten optimalen Mischungsverhältnisses von Indol : DL-Serin vom berechneten Wert. Wie Tab. 17 zeigt, konnte das Indol dann nicht quantitativ zu Try umgesetzt werden, wenn zu wenig L-Serin zugegeben wurde. In diesem Fall wurde dann das Indol zum Teil abgebaut, da der Stamm A_1 diese Substanz als einzige N-Quelle verwerten kann.

Das ausgeschiedene Try übt keinen Einfluß auf die weitere Try-Bildung aus, wie folgendes Experiment demonstriert. Wurden unter den gleichen Kulturbedingungen,wie oben beschrieben, dem Stamm A_1 neben 1 g/l Indol und 2 g/l DL-Serin noch 1 g/l bzw.

2 g/l Try verfüttert, so betrug nach weiteren 24 Std. Inkubation die Try-Konzentration im Medium 3 g/l bzw. 4 g/l.

Der zeitliche Verlauf der Try-Produktion und des Indolverbrauchs unter den obigen Kulturbedingungen bei den Stämmen Ind_2 und A_1 ist in der folgenden Abb. 10 dargestellt. Während die Indolmenge nach 24 Std. Inkubation nach Zugabe von 1,5 g/l Indol und 3 g/l DL-Serin im Kulturmedium der beiden Stämme etwa gleich war, lag die Try-Konzentration im Medium des Stammes A_1 nach dieser Zeit um das 3-fache höher als beim Stamm Ind_2. Die begrenzenden Faktoren für die Try-Synthese waren beim Stamm A_1 die L-Serinmenge und beim Stamm Ind_2 die Tryptophan-synthetase-Aktivität. Eine Verlängerung der Inkubationsdauer hatte keine Steigerung der Try-Ausscheidung

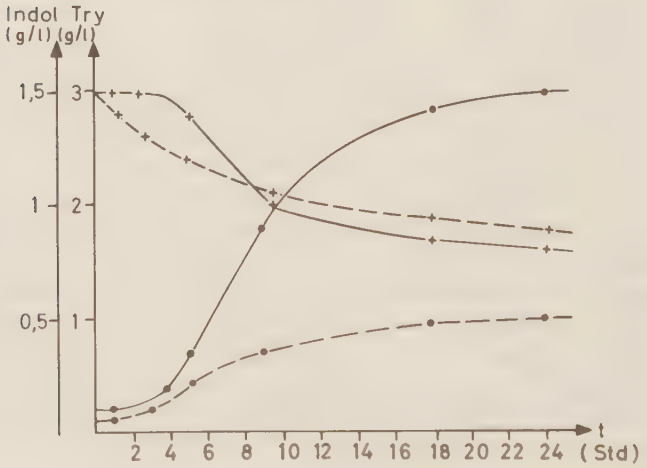

Abb. 10: Try-Bildung (•) und Indolverbrauch (+) der Stämme Ind_2 (---) und A_1 (——) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer nach Zugabe von 1,5 g/l Indol und 3 g/l DL-Serin. Die Kulturbedingungen sind im Text beschrieben.

zur Folge. Die beiden Stämme unterschieden sich außerdem sehr stark im Indolverbrauch bzw. in bezug auf die Abnahme der Indolkonzentration im Medium innerhalb der ersten 5 Std. nach Zugabe von Indol und DL-Serin. Obwohl die Try-Produktion sofort nach Zusatz von Indol und DL-Serin bei beiden Stämmen begann, nahm die Indolkonzentration im Medium des Stammes A_1 im Gegensatz zu Ind_2 die ersten 2,5 Std. nicht ab. Der Grund hierfür ist die sofort beginnende Indol-Biosynthese des Stammes A_1.

8. Try-Produktion aus Anthranilsäure

a) Try-Ausscheidung bei Anth-Verfütterung

Nachdem die Versuche zur Try-Bildung aus Indol und Ser gezeigt hatten, daß die Try-Biosynthesekette im Stamm Ind_2 völlig dereguliert ist, wurde nun versucht, die Try-Produktion dieses Stammes durch Zugabe von Anth, dem ersten Zwischenprodukt des Try-Biosynthesezweiges, zum Kulturmedium entsprechend zu steigern. Wie aber aus der folgenden Tabelle 18 zu ersehen

Tabelle 18: Try-Bildung des Stammes Ind_2 bei Zugabe von Anth, D-Ribose, DL-Serin und Indol zum Minimalmedium

Zusätze (mg/l)	Wachstum (Zellzahl/ml)	Try-Ausscheidung (mg/l)
-	$5{,}5 \times 10^9$	60
100 Anth	$5{,}5 \times 10^9$	26
150 Anth	$4{,}0 \times 10^9$	23
100 Anth + 500 DL-Serin	$5{,}5 \times 10^9$	28
100 Anth + 1000 D-Ribose	$5{,}5 \times 10^9$	26
100 Anth + 500 DL-Serin + 1000 D-Ribose	$5{,}5 \times 10^9$	27
100 Anth + 100 Indol	$5{,}5 \times 10^9$	150

ist, wurde durch den Zusatz von Anth die Try-Ausscheidung von Ind_2 um etwa 50 % reduziert.

Diese Hemmung der Try-Bildung durch Anth konnte nicht durch die Zugabe von L-Serin und D-Ribose - Substanzen, die bei der Try-Biosynthese benötigt werden - aufgehoben werden. Die Aktivität der Tryptophan-synthetase scheint nicht durch Anth beeinflußt zu werden, da durch diese Verbindung die Try-Produktion aus Indol nicht reduziert wurde (Tab. 18). Die hemmende Wirkung der Anth auf die Try-Synthese beruht vermutlich darauf, daß diese Substanz das vierte Enzym der Try-Biosynthese, die Indol-3-glycerol-phosphat-synthetase, hemmt (GIBSON und YANOFSKY, 1960). LESTER und YANOFSKY, 1961 nannten diesen Regulationsvorgang "Feedforward-Hemmung".

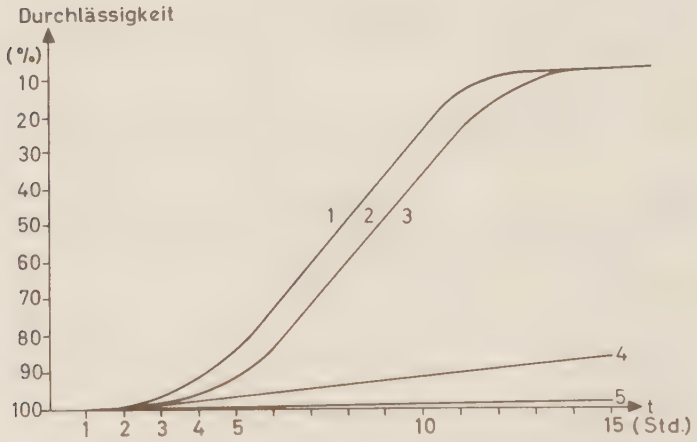

Abb. 11: Wachstumshemmende Wirkung der Anth auf die Submerskultur von Ind_2. Die Anthranilsäure wurde in verschiedenen Konzentrationen nach dem Animpfen zugegeben (t = 0).
1 : Kontrolle, 2 : 0,5 mM Anth, 3 : 1 mM Anth, 4 : 2 mM Anth, 5 : 4 mM Anth

b) Isolierung von Mutanten, die gegen Anthranilsäure resistent sind

Es wurde nun versucht, Mutanten vom Stamm Ind_2 zu gewinnen, bei denen die Feedforward-Hemmung der Anth auf die InGP-synthetase ausgeschaltet ist. Als Selektionskriterium für solche Mutanten wurde die Resistenz gegen Anth gewählt, da deren wachstumshemmende Wirkung (Abb. 11) ebenfalls auf einer Hemmung der InGP-synthetase beruhen soll (GIBSON und YANOFSKY, 1960). Einige Mutanten vom Stamm Ind_2, die gegen 3 mM Anth resistent sind, INA genannt, wurden auf Try-Ausscheidung in Minimalmedium mit und ohne Anth-Zusatz untersucht (Tab. 19).

Wie die Tabelle 19 zeigt, schieden einige der Stämme INA etwas mehr Try ins Medium aus als der Ausgangsstamm Ind_2, wenn keine Anthranilsäure zugegeben wurde. So fanden SCHLEGEL und JANNASCH, 1967, daß Anth-resistente Mutanten einen erhöhten

Tabelle 19: Try-Produktion einiger INA-Stämme in Minimalmedium mit und ohne Anth-Zusatz

Stamm	Zusätze (mg/l)	Wachstum (Zellzahl/ml)	Try-Bildung (mg/l)
INA_1	-	$5{,}5 \times 10^9$	70
INA_1	100 Anth	$5{,}5 \times 10^9$	32
INA_1	200 Anth	$5{,}5 \times 10^9$	35
INA_1	400 Anth	$5{,}5 \times 10^9$	34
INA_2	-	$5{,}5 \times 10^9$	65
INA_2	200 Anth	$5{,}5 \times 10^9$	30
INA_3	-	$5{,}5 \times 10^9$	62
INA_3	200 Anth	$5{,}5 \times 10^9$	27
INA_4	-	$5{,}5 \times 10^9$	60
INA_4	200 Anth	$5{,}5 \times 10^9$	30
INA_5	-	$5{,}5 \times 10^9$	55
INA_5	200 Anth	$5{,}5 \times 10^9$	25

Enzymspiegel für die Try-Biosynthese-Enzyme haben. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß die Anthranilsäure hemmend in die Try-Synthese eingreift. Durch die Zugabe von Anth zum Kulturmedium wurde jedoch auch bei diesen Mutanten INA die Try-Produktion noch um etwa 50 % reduziert.

Es wurden deshalb von dem Stamm INA_1 35 Mutanten isoliert, die gegen 7 mM Anth resistent sind. Eine dieser Mutanten, IHA_{16}, schied bei Zugabe von 200 mg/l Anth zum Minimalmedium 62 mg/l Try aus, während ohne Anth-Zusatz die Try-Bildung dieses Stammes nur 41 mg/l betrug. In dieser Mutante IHA_{16} scheint somit die Feedforward-Hemmung der Anth auf die InGP-synthetase weggefallen zu sein, da die Try-Produktion durch Anth nicht nur nicht mehr gehemmt, sondern sogar noch gesteigert wird. Außerdem wird das Wachstum des Stammes IHA_{16} durch geringe Mengen Anth im Minimalmedium beschleunigt (Abb. 12).

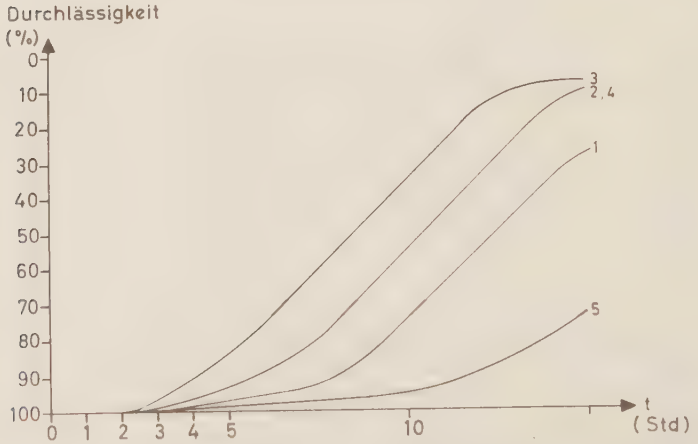

Abb. 12: Wachstumskurven des Stammes IHA_{16} bei Zugabe verschiedener Anth-Mengen
1: Kontrolle, 2: 0,5 mM Anth, 3: 1 mM Anth, 4: 2 mM Anth, 5: 3 mM Anth

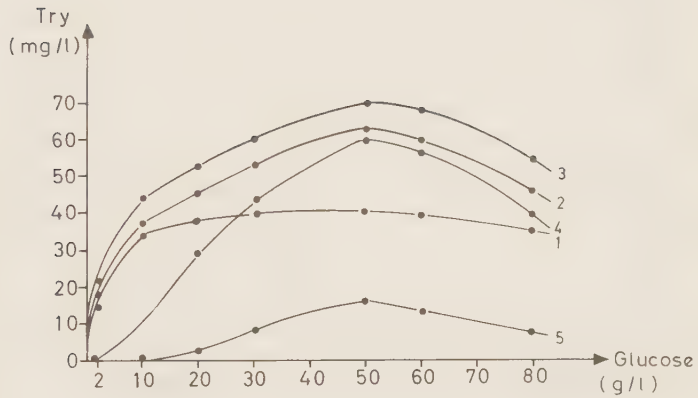

Abb. 13: Abhängigkeit der Try-Produktion des Stammes IHA_{16} von der Glucose-Konzentration bei verschiedenen Anth-Mengen im Medium
1 : Kontrolle, 2 : 1 mM Anth, 3 : 3 mM Anth, 4 : 5 mM Anth, 5 : 7 mM Anth

c) Optimierung der Kulturbedingungen für die Try-Bildung des Stammes IHA_{16} aus Anthranilsäure

Durch Variation der Kulturbedingungen wurde nun versucht, die Try-Ausscheidung des Stammes IHA_{16} bei Anth-Verfütterung zu steigern. Zunächst wurde die Try-Bildung in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration im Minimalmedium für verschiedene Anth-Mengen untersucht. Wie die Versuchsergebnisse in Abb. 13 zeigen, ist der Einfluß der Anth auf die Try-Produktion des Stammes IHA_{16} abhängig von der Glucose-Konzentration im Medium. Diese Abhängigkeit beruht jedoch, wie aus Abb. 14 zu ersehen ist, hauptsächlich darauf, daß die Anth bei niederen Glucose-Konzentrationen im Medium stärker wachstumshemmend wirkt als bei höheren, und da die Try-Bildung weit-

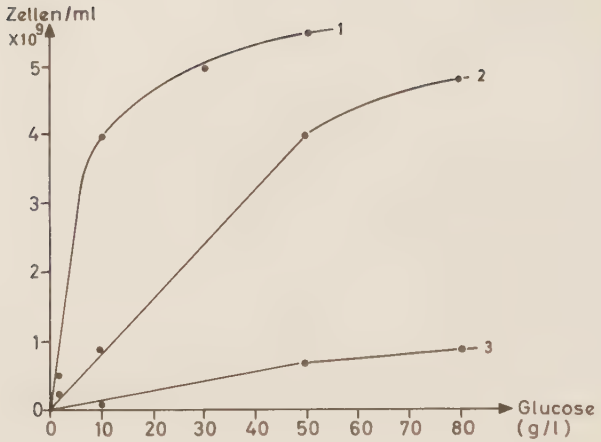

Abb. 14: Abhängigkeit des Wachstums des Stammes IHA_{16} von der Glucose-Konzentration im Minimalmedium bei verschiedenen Anth-Gaben
1 : 3 mM Anth, 2 : 5 mM Anth, 3 : 7 mM Anth

gehend proportional zum Wachstum ist, führt dieser Effekt bei niederen Glucosegaben zur Reduzierung der Try-Ausscheidung. Die Steigerung der Try-Produktion durch Erhöhung der Anth-Konzentration von 1 mM auf 3 mM im Kulturmedium deutet darauf hin, daß dieser Stamm IHA_{16} doch ein Teil der zugesetzten Anth zu Try umwandeln kann. Ferner konnte eine Abnahme der Anth im Medium nach 65 Std. Inkubation des Stammes IHA_{16} nachgewiesen werden (Tab. 22).

Wie die Abb. 15 zeigt, ist die Try-Produktion des Stammes IHA_{16} bei Anth-Verfütterung außerdem abhängig von der Konzentration des als N-Quelle dienenden $(NH_4)_2SO_4$ im Medium. Doch wie aus der Abb. 16 zu ersehen ist, beruht dieser Effekt ebenfalls auf einer Beeinflussung des Wachstums. Die

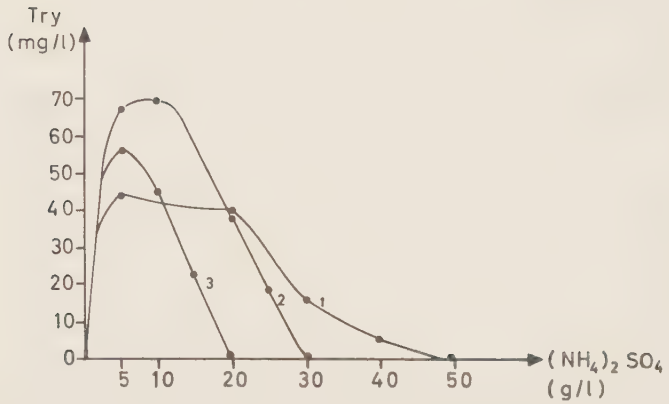

Abb. 15: Try-Ausscheidung des Stammes IHA_{16} bei Anth-Verfütterung in Abhängigkeit von der $(NH_4)_2SO_4$-Konzentration im Medium
1 : Kontrolle, 2 : 3 mM Anth, 3 : 5 mM Anth

wachstumshemmende Wirkung der Anth auf IHA_{16} scheint durch eine Erhöhung der $(NH_4)_2SO_4$-Konzentration im Kulturmedium verstärkt zu werden, was eine Abnahme der Try-Bildung zur Folge hat.

Da bei der Try-Bildung aus Indol gezeigt werden konnte, daß auch das Ser für die Try-Produktion begrenzend ist, wurde nun versucht, die Try-Ausscheidung des Stammes IHA_{16} bei Anth-Verfütterung durch Zugabe einiger Substanzen zu steigern, die direkt oder indirekt für die Try-Biosynthese benötigt werden. Wie aus der Tab. 20 zu ersehen ist, konnte durch Zusatz von D-Ribose zum Kulturmedium die Try-Produktion aus Anth nicht erhöht werden. Dagegen gelang es durch Zugabe von Ala bzw. Ser, die Try-Bildung um 15 bzw. 30 % zu steigern. Diese Be-

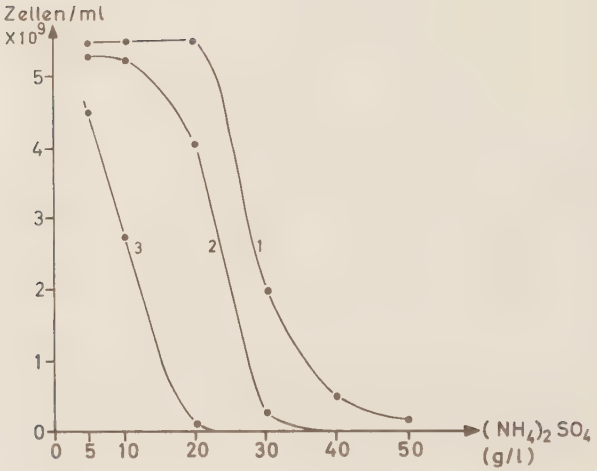

Abb. 16: Wachstumsabhängigkeit des Stammes IHA_{16} von der $(NH_4)_2SO_4$-Konzentration im Medium mit verschiedenen Anth-Mengen
1 : Kontrolle, 2 : 3 mM Anth, 3 : 5 mM Anth

funde zeigen, daß einerseits das vom Organismus gebildete Ser für die Try-Synthese begrenzend wirkt - wie bei der Indolumwandlung schon festgestellt wurde - und andererseits, daß die Anth auch von diesem Stamm nur in geringen Mengen zu Indol bzw. Try umgesetzt werden kann. Der Zusatz von Gly führte zu einer Hemmung der Try-Ausscheidung, die weder durch Ala noch durch Ser aufgehoben werden konnte (HISHINUMA et al., 1969). Da die Try-Bildung aus Indol und Ser durch Gly nicht beeinflußt wird, hemmt das Gly vermutlich die Synthese von Indol bei Anth-Gabe.

Die Try-Produktion aus Anth konnte bei dem Stamm IHA_{16} auch nicht dadurch wesentlich gesteigert werden, daß die Kultur pH-statisch gezüchtet wurde, oder die Anth zu verschiedenen Wachstumsphasen zugegeben wurde.

Tabelle 20: Try-Ausscheidung des Stammes IHA_{16} bei Zugabe von Anth, D-Ribose, Ala, Ser und/oder Gly zum Minimalmedium in einer Konzentration von je 200 mg/l

Zusätze	Wachstum (Zellen/ml)	Try-Bildung (mg/l)
-	$5{,}5 \times 10^9$	41
Anthranilsäure	$5{,}5 \times 10^9$	62
Glycin	$5{,}5 \times 10^9$	40
D-Ribose	$5{,}5 \times 10^9$	42
L-Serin	$5{,}5 \times 10^9$	45
L-Alanin	$5{,}5 \times 10^9$	44
Anth + Ala	$5{,}5 \times 10^9$	70
Anth + Gly	$5{,}5 \times 10^9$	35
Anth + D-Ribose	$5{,}5 \times 10^9$	63
Anth + Ser	$5{,}5 \times 10^9$	80
Anth + D-Ribose + Ser	$5{,}5 \times 10^9$	80
Anth + D-Ribose + Gly	$5{,}5 \times 10^9$	35
Anth + Gly + Ser	$5{,}5 \times 10^9$	36
Anth + Gly + Ala	$5{,}5 \times 10^9$	34
Anth + Gly + Ser + Indol	$5{,}5 \times 10^9$	460

d) Wachstumshemmende Wirkung der Anthranilsäure

Da auch bei der Mutante IHA_{16} keine wesentliche Steigerung der Try-Bildung bei Anth-Verfütterung erfolgte, obwohl dieser Stamm in der Try-Biosynthese dereguliert und gegen sehr hohe Anth-Konzentrationen (7 mM) resistent ist, wurde vermutet, daß die Anth neben der InGP-synthetase noch an anderen Stellen im Stoffwechsel von E. coli hemmend eingreift. Es wurde deshalb die Wirkung der Anth auf das Wachstum von E. coli K 12 etwas näher untersucht.

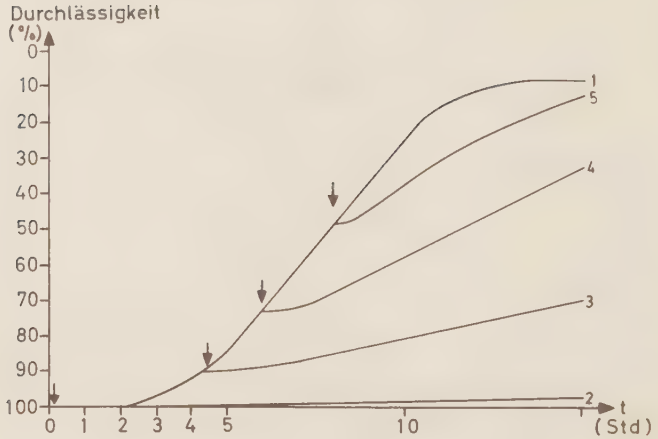

Abb. 17: Die Wirkung von Anth (500 mg/l) auf das Wachstum von E. coli K 12 (W 1485) in verschiedenen Wachstumsphasen
1 : Kontrolle 2 - 5 : Zugabe von je 500 mg/l Anth zu den verschiedenen Zeiten 2 : 0 Std., 3 : 4,5 Std., 4 : 6 Std., 5 : 8 Std. nach dem Animpfen

Wie die Abb. 17 zeigt, hemmen 500 mg/l Anth sofort nach ihrer Zugabe das Wachstum des Stammes W 1485. Bei Zugabe der Anth in der lag-Phase wurde innerhalb der folgenden 15 Std. kein Wachstum mehr beobachtet, während die Kultur bei Anth-Zusatz in der exponentiellen Wachstumsphase nach etwa einer halben Std. mit stark verlängerter Generationszeit wieder zu wachsen begann.

Im folgenden wurde zur Aufklärung der Wirkungsweise der Anth nach Substanzen gesucht, die ihre Wachstumshemmung aufheben können. Wie aus Abb. 18 zu ersehen ist, konnte die Hemmung von 500 mg/l Anth auf das Wachstum des Stammes W 1485 nicht

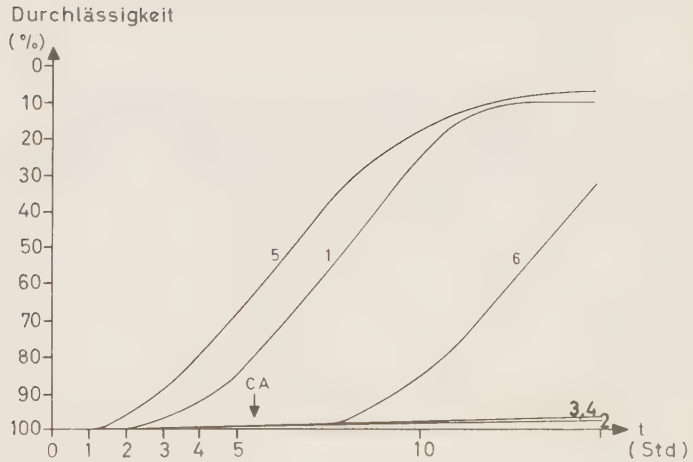

Abb. 18: Aufhebung der wachstumshemmenden Anth-Wirkung bei dem Stamm W 1485 durch Casamino Acids
1 : Kontrolle, 2 - 6 je 500 mg/l Anth-Zusatz nach dem Animpfen; außerdem wurden sofort zugegeben zu 3 : 50 mg/l Try, 4 : je 50 mg/l Phe, Try und Tyr, 5 : 5 g/l Casamino Acids, bei 6 die gleiche Menge nach 5,5 Std.

durch Try oder Phe, Try und Tyr, sondern durch Casamino Acids aufgehoben werden. Die Anth wirkt in dieser Konzentration bakteriostatisch, da die Zugabe von Casamino Acids nach 5,5 Std. nach Anth-Zusatz dem Stamm W 1485 auch noch das Wachstum ermöglichte (Kurve 6). Um nun zu ermitteln, welche der übrigen biogenen Aminosäuren in den Casamino Acids auf die Anth antagonisierend wirken, wurden diese einzeln im Plattendiffusionstest geprüft. Dabei wurde gefunden, daß die Aminosäuren Ile, Leu, Met oder Thr oder Homoserin, ein Zwischenprodukt der Met- und Thr-Biosynthese, die Bakteriostase der Anth aufheben können (Tab. 21).

Tabelle 21: Substanzen, die die Wachstumshemmung von je 500 mg/l Anthranilsäure, 3-Methylanthranilsäure, 4-Methylanthranilsäure oder 5-Methylanthranilsäure auf E. coli K 12 (W 1485) aufheben können

Metabolitenlösungen für Testplättchen (2 g/l)	Antimetaboliten im Agar der Testplatten in einer Konzentration von jeweils 500 mg/l			
	Anthranilsäure	3-Methylanthranilsäure	4-Methylanthranilsäure	5-Methylanthranilsäure
Ile	++	++	+	-
Leu	+	+	±	-
Met	++	++	+	-
Thr	+++	+++	++	-
Try	-	-	++	+++
Homoserin	++	++	+	-
Indol	-	-	+	++
Anthranilsäure	-	-	±	+

+++ = sehr starken Wachstumshof
++ = starken Wachstumshof
+ = Wachstumshof
± = sehr schwachen Wachstumshof
- = keinen Wachstumshof

Die Wachstumshemmung von 3-Methylanthranilsäure, die nach GIBSON und YANOFSKY, 1960 ebenfalls wie die Anthranilsäure und die 4- und 5-Methylanthranilsäure hemmend auf die InGP-synthetase wirkt, wurde durch die gleichen Aminosäuren aufgehoben (Tab. 21). Dies ist vermutlich auch der Grund für die Kreuzresistenz, die zwischen Anth und 3-Methylanthranilsäure beobachtet wurde. Die Wirkung von 4-Methylanthranilsäure wurde neben diesen genannten Aminosäuren auch durch Try oder die Try-Biosynthese-Zwischenprodukte Indol oder Anth antagonisiert. Die wachstumshemmende Wirkung von 5-Methylanthranilsäure konnte dagegen nur durch Try, Indol oder Anth aufgehoben werden. In bezug auf die aufhebenden Substanzen nimmt die 4-Methylanthranilsäure somit eine Mittelstellung

zwischen Anth und 3-Methylanthranilsäure einerseits und 5-Methylanthranilsäure andererseits ein (Tab. 21). Dies ist sehr wahrscheinlich durch die unterschiedliche Stereospezifität der regulatorischen Zentren der entsprechenden Enzyme, auf die diese Stoffe wirken, bedingt.

Auch in den Biophotometerversuchen (Abb. 19) konnte die Wachstumshemmung von 500 mg/l Anth spezifisch durch die Aminosäuren Ile, Leu, Met oder Thr einzeln und in Kombination aufgehoben werden. Diese Versuche zeigen somit sehr deutlich, daß die eigentliche wachstumshemmende Wirkung von 500 mg/l Anth nicht darauf beruht, daß sie die Try-Biosynthese hemmt, sondern vielmehr darauf, daß die Anth hemmend in die Synthese der Aminosäuren der Aspartat-Familie eingreift. Die schwache aufhebende Wirkung von Leu beruht vermutlich darauf, daß Leu

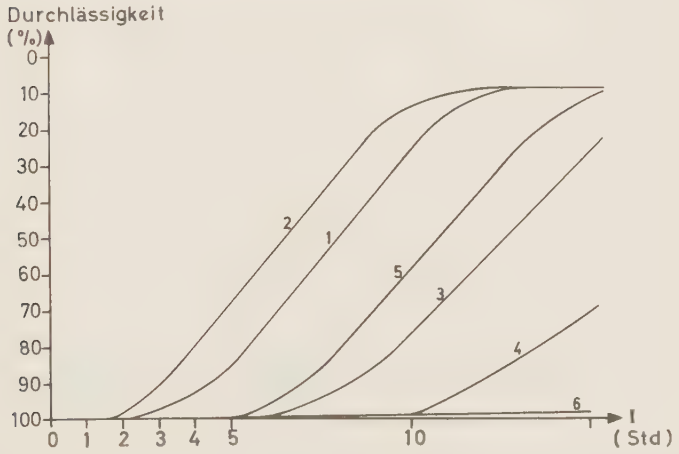

Abb. 19: Aufhebung der Anth-Wirkung auf den Stamm W 1485 durch die Aminosäuren Ile, Leu, Met, Thr und Val. 1 : Kontrolle, 2 - 6 erhielten zur Zeit t = 0 je 500 mg/l Anth, außerdem wurden zugegeben zu 2 : je 50 mg/l Ile, Leu und Val, 3 : 50 mg/l Leu, 4 : 10 mg/l Thr, 5 : 50 mg/l Met

wie Val aktivierend auf die Biosynthese-Enzyme dieser Aminosäuren wirkt (CHANGEUX, 1963). Die sofortige bakteriostatische Wirkung der Anthranilsäure weist darauf hin, daß dieses Zwischenprodukt der Try-Biosynthese als negativer Effektor die Aktivität eines oder mehrerer allosterischer Enzyme der Aminosäure-Biosynthese der Aspartat-Familie beeinflußt. Ein weiterer Hinweis für die Richtigkeit dieser Vermutung ist der Befund, daß die Anthranilsäure-resistente Mutante IHA_{16} neben Try noch 30 mg/l L-Leucin und 28 mg/l L-Valin ins Kulturmedium ausscheidet. Außerdem wurden mit Hilfe des Aminosäure-Analysers im Kulturfiltrat dieses Stammes noch 14 mg/l L-Phenylalanin und 5 mg/l L-Tyrosin nachgewiesen.

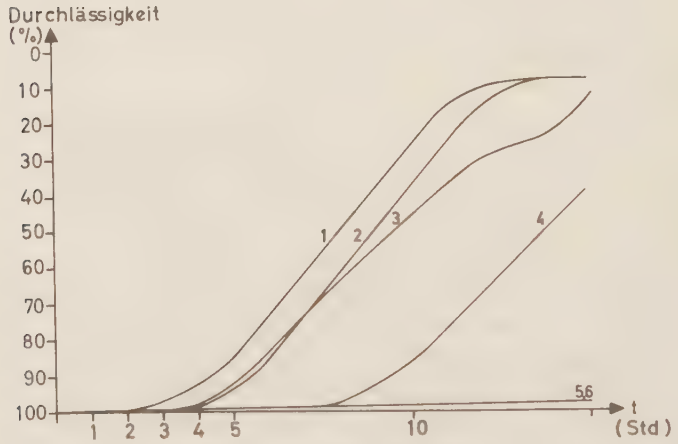

Abb. 20: Aufhebung der wachstumshemmenden Wirkung von 5-Methylanthranilsäure auf W 1485 durch Try, Indol oder Anth
1 : Kontrolle, 2 - 6 erhielten je 100 mg/l 5-M-Anth zur Zeit t = 0, und außerdem wurden zugegeben 2 : 50 mg/l Try, 3 : 50 mg/l Anth, 4 : 50 mg/l Indol und 5 : 1 g/l Casamino Acids

e) Isolierung und Untersuchung 5-Methylanthranilsäure resistenter Mutanten

Wie die Abb. 20 zeigt, wird die bakteriostatische Wirkung von 100 mg/l 5-M-Anth durch je 50 mg/l Try, Anth oder Indol aufgehoben, dagegen nicht durch Casamino Acids. Im Kreuztest wurde nachgewiesen, daß die Hemmung von 5-M-Anth durch Try oder Indol unkompetitiv und durch Anth kompetitiv aufgehoben werden kann (VOLCANI et al., 1954). Diese Befunde sprechen für die Annahme, daß 5-M-Anth primär auf die InGP-synthetase hemmend wirkt. Es wurden deshalb von dem Stamm IHA_{16} eine Anzahl Mutanten isoliert, die gegen 5 mM 5-M-Anth re-

Tabelle 22: Try-Bildung der Stämme IHA_{16}, IMA_1, IMA_2 und IMA_3 bei Zugabe von Anthranilsäure und L-Serin zum Minimalmedium

Stamm	Zusätze (mg/l)	Nach 65 Std. Inkubation: Wachstum (Zellen/ml)	Anthranilsäure (mg/l)	Try-Produktion (mg/l)
IHA_{16}	-	$5{,}5 \times 10^9$	-	41
IHA_{16}	500 Anth	$5{,}5 \times 10^9$	450	70
IHA_{16}	500 Anth + 500 Ser	$5{,}5 \times 10^9$	410	95
IMA_1	-	$5{,}0 \times 10^9$	-	30
IMA_1	500 Anth	$5{,}0 \times 10^9$	400	100
IMA_1	500 Anth + 500 Ser	$5{,}0 \times 10^9$	360	150
IMA_2	-	$5{,}0 \times 10^9$	-	40
IMA_2	500 Anth	$5{,}0 \times 10^9$	430	70
IMA_2	500 Anth + 500 Ser	$5{,}0 \times 10^9$	390	120
IMA_3	-	$4{,}5 \times 10^9$	-	30
IMA_3	500 Anth	$4{,}5 \times 10^9$	450	75
IMA_3	500 Anth + 500 Ser	$4{,}5 \times 10^9$	370	140

sistent sind. Der Stamm IHA_{16} zeigte keine Kreuzresistenz gegenüber dieser Substanz.

Die Try-Produktion aus Anth und Ser war bei diesen 5-M-Anth-resistenten Mutanten IMA wesentlich höher als bei dem Stamm IHA_{16} (Tab. 22). Doch ist auch für die Transformation von Anth zu Try wie bei der Try-Bildung aus Indol die Zugabe von L-Serin nötig. Es wäre denkbar, daß durch Optimalisierung der Kulturbedingungen die Try-Ausscheidung des Stammes IMA_1 bei Anth- und Ser-Verfütterung noch gesteigert werden kann.

IV. Diskussion

Nach den vorliegenden Ergebnissen greifen die Strukturanalogen von Try, 5-MT und 5-FT, wie das Try in die Regulation der Biosynthese dieser Aminosäure ein. Sie hemmen auf diese Weise die Synthese des Metaboliten Try, ohne dann aber im Stoffwechsel dessen Funktion übernehmen zu können. Dies hat zur Folge, daß diese Try-Analogen als Antimetaboliten bakteriostatisch wirken. Es wurden in den letzten Jahren eine Anzahl Mutanten von E. coli K 12 isoliert und beschrieben, die gegen 5-MT resistent waren; diese kann man nach dem Mutantionsort in folgende 5 Gruppen einteilen (Abb. 21):

1.) Mutation im Regulatorgen Try R; es kann somit kein funktionstüchtiger Aporepressor für das Try-Operon mehr gebildet werden (COHEN und JACOB, 1959).

2.) Mutation im Strukturgen E des Try-Operons, die dazu führt, daß die Anthranilat-synthetase keiner Feedback-Hemmung mehr durch das Endprodukt Try unterliegt (MOYED, 1960; SOMERVILLE und YANOFSKY, 1965; MORSE und YANOFSKY, 1969a).

3.) Mutation im Operator O des Try-Operons, die zur Folge hat, daß sich der aktive Repressor nicht mehr an die Operatorregion anlagern und die Transkription blockieren kann (HIRAGA, 1969).

4.) Mutation im Strukturgen der "Aromaten-permease"; es wird somit kein 5-MT mehr in die Zelle transportiert (HIRAGA et al., 1968; AMES, 1964).

5.) Mutation im Mtr-Gen; der Mechanismus ist hier noch unbekannt (HIRAGA et al., 1968).

In der Literatur sind zwei Gruppen von 5-MT resistenten Mutanten beschrieben, die Try ins Kulturmedium ausscheiden (FOWDEN et al., 1967). Der eine Mutantentyp besitzt ein defektes Regulatorgen für das Try-Operon (Try R^-), die Enzyme des Try-Biosynthesezweiges sind in diesen Stämmen konstitutiv,

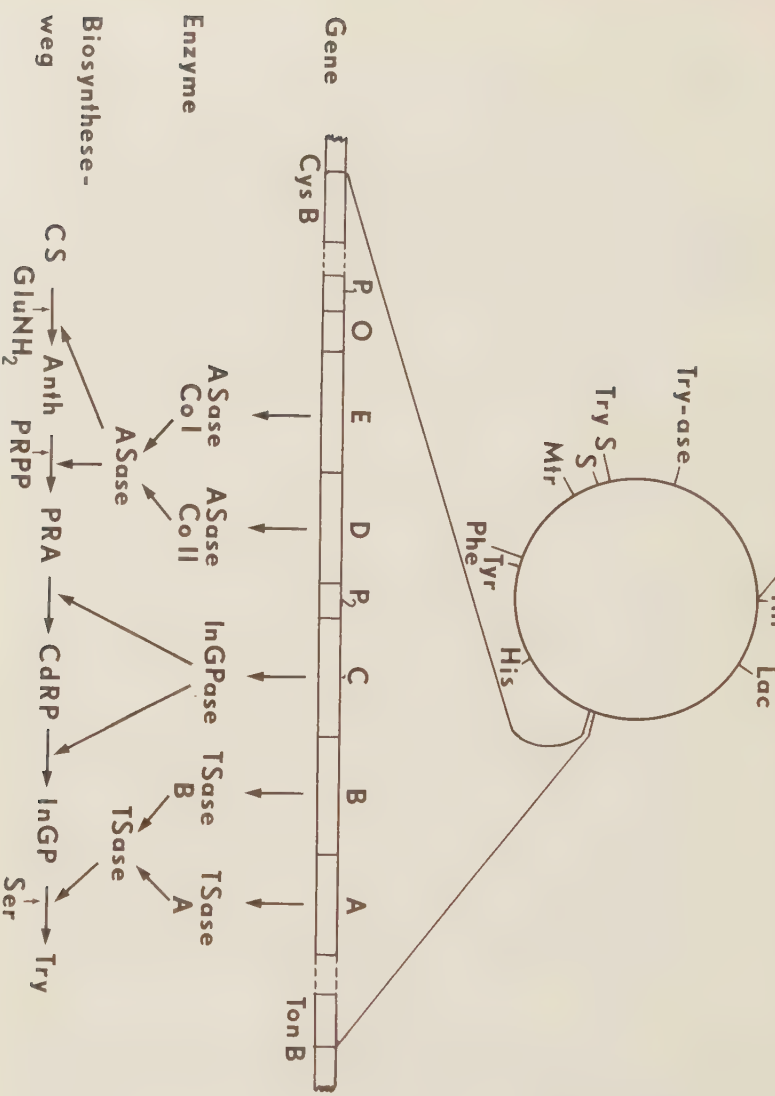

Abb. 21: Genkarte von E. coli K 12 mit den Genen für die Enzyme der Try-Biosynthese (TAYLOR, 1970)

während die Anthranilat-synthetase und Phosphoribosylanthranilat-transferase noch voll der Feedback-Hemmung durch Try unterliegen (COHEN und JACOB, 1959). Der zweite Typ hat eine Mutation im Strukturgen E des Try-Operons, die zu einer Veränderung des regulatorischen Zentrums der Anthranilat-synthetase führte, während das katalytische Zentrum unverändert blieb. Das Enzym ist dadurch unempfindlich geworden gegenüber den allosterischen Effektoren wie z. B. Try oder 5-MT. Die gesamten Enzyme der Try-Biosynthesekette können jedoch in diesem Mutantentyp noch reprimiert werden (MOYED, 1960).

Wie die Untersuchungen auf Derepression der Enzyme des Try-Operons zeigen, wurde in dieser Arbeit der zweite Mutantentyp isoliert und untersucht. Da der Stamm MT_5 die Try-Biosynthese-Enzyme nicht konstitutiv bildet, obwohl er Try ins Medium ausscheidet, kann die Überproduktion dieser Aminosäure nur darauf beruhen, daß dieser Stamm eine Anthranilat-synthetase besitzt, die keiner Feedback-Hemmung mehr unterliegt. Dieser Befund stimmt mit der Vermutung von COHEN, 1965 überein, daß nur solche 5-MT resistenten Mutanten Try in größeren, nachweisbaren Mengen ausscheiden, bei denen die Feinregulation, die Endprodukt-Hemmung, defekt ist. Beim Ausfall der Grobregulation, der Repression, wird eine Überproduktion eines Biosynthese-Endproduktes weitgehend durch die intakte Feedback-Hemmung verhindert (HILL und SCHLEGEL, 1969).

Die große Steigerung der Try-Bildung bei der Mutante FMT_1 ist darauf zurückzuführen, daß durch die zweite Mutation, die zur Resistenz gegen 5-FT geführt hat, in diesem Stamm neben der Feedback-Hemmung auch noch der zweite Regulationsmechanismus der Try-Biosynthese, die Repression, ausgefallen ist. So fanden CALVO und CALVO, 1967, daß Mutanten von Salmonella typhimurium, bei denen diese beiden Regulationsmechanismen für die Leucin-Biosynthese defekt waren, große Mengen Leucin ins Medium ausschieden, während Stämme, in denen nur einer dieser Kontrollmechanismen ausgefallen war, nur sehr geringe Mengen Leucin im Medium anhäuften.

Entgegen den Befunden in dieser Arbeit nahmen BANDIERA et al., 1967 an, daß in den Stämmen, die gegen 5-MT resistent sind, die Try-Biosynthese-Enzyme dereprimiert sind und daß die 5-FT Resistenz durch den Ausfall der Feedback-Hemmung bedingt war. BROWNE et al., 1970 fanden, daß 5-FT sehr gut ins Protein eingebaut wird, während 5-MT nicht ins Protein eingebaut werden kann (BANDIERA et al., 1967). Bei Bakterien spielt aber häufig nicht die freie Aminosäure, sondern der Amino-acyl-t-RNS-Komplex als Corepressor eine Rolle. Dies konnte bisher gezeigt werden für Isoleucin und Valin (EIDLIC und NEIDHARDT, 1965), für Histidin (ROTH und AMES, 1966), für Phenylalanin (DUDA et al., 1968) und für Threonin (NASS et al., 1969). Es gibt nun auch die ersten Hinweise dafür, daß der Tryptophanyl-t-RNS-Komplex bei der Repression der Try-Enzyme beteiligt ist und nicht die freie Aminosäure (ITO et al., 1969a; ITO et al., 1969b). So sind Mutanten mit einer reduzierten Tryptophanyl-t-RNS-synthetase-Aktivität unter gewissen Bedingungen dereprimiert (DOOLITTLE und YANOFSKY, 1968), oder sie können durch Try-Zugabe in den Try-Biosynthese-Enzymen nicht in dem Maße reprimiert werden wie der Wildtyp (KANO et al., 1968). Da 5-FT ins Protein eingebaut wird, wird es auch an die $t\text{-}RNS_{Try}$ angehängt im Gegensatz zu 5-MT (DOOLITTLE und YANOFSKY, 1968; ITO et al.,1969a). Es ist somit sehr wahrscheinlich, daß 5-FT bevorzugt als "falscher Corepressor" und 5-MT in erster Linie als "falscher Feedback-Hemmer" auf die Regulation der Try-Biosynthese wirken. So ist 7-MT, das nicht ins Protein eingebaut wird, auch kein aktiver Corepressor, wohl aber ein starker Feedback-Hemmer für die Try-Enzyme (HELD und SMITH, 1970). Für die Richtigkeit dieser Hypothese sprechen zwei Befunde dieser Arbeit. Erstens waren nur die 5-FT resistenten Mutanten dereprimiert, und zweitens gelang es BANDIERA et al., 1967 und in dieser Arbeit nicht, Mutanten von E. coli K 12 zu isolieren, die nur gegen 10^{-3} M 5-FT resistent waren. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß in der Try-Biosynthese dereprimierte Stämme so wenig Try im Überschuß synthetisieren, daß auch bei die-

sen Stämmen immer noch ein Teil des zugesetzten 5-FT ins Protein anstelle von Try eingebaut wird, was zu einer teilweisen Funktionsuntüchtigkeit der Proteine und damit zu einer Wachstumshemmung führt (BROWNE et al., 1970).

Mutanten von FMT_1, bei denen nicht nur die Regulationsmechanismen der Try-, sondern auch der Phenylalanin- und Tyrosin-Biosynthese ausgeschaltet wurden, scheiden auch dann nicht wesentlich mehr Try ins Kulturmedium aus, wenn die Stämme noch für die Endprodukte Phe und/oder Tyr auxotroph sind. Vergleichsweise führten bei Lysin- oder Threonin-produzierenden Organismen entsprechende Mutationen in diesen Biosynthesewegen zu einer großen Steigerung der Aminosäure-Produktion (NAKAYAMA et al., 1961; SHIIO und NAKAMORI, 1969).

Der Grund für die sehr begrenzte Try-Bildung dieser Stämme war aber auch nicht der Abbau des Try oder die zelluläre Permeabilitätsbarriere, wie die entsprechenden Versuche zeigen, sondern vielmehr das sehr komplizierte Zusammenspiel einiger Biosynthesewege. So konnte durch Zugabe von Indol und L-Serin - Substrate des letzten Enzyms der Try-Biosynthese, der Tryptophan-synthetase B, - die Try-Produktion des Stammes A_1 bis auf 5 g/l gesteigert werden. Unter günstigen Kulturbedingungen und bei Zugabe großer L-Serinmengen wurde sogar wesentlich mehr Try gebildet als nach der stöchiometrischen Berechnung unter Berücksichtigung des zugesetzten Indols zu erwarten war. Die unerwartet hohe Ausbeute ist darauf zurückzuführen, daß das zugesetzte Indol die Synthese von Indol in dem Stamm A_1 um ein Vielfaches steigert. Das zugegebene und das neusynthetisierte Indol kann jedoch nur dann zu Try umgesetzt werden, wenn entsprechende Mengen an L-Serin - dem zweiten Substrat der Tryptophan-synthetase - dem Medium zugegeben werden. Die Zelle kann somit die Try-Biosynthese, wenn deren Regulationsmechanismen defekt sind, noch über die L-Serinmenge regulieren, die sie für die Try-Bildung aus Indol zur Verfügung stellt. So konnten auch HOCH und DEMOSS, 1966 bei Bacillus alvei eine Indol-Ausscheidung durch Spaltung von Indol-3-

glycerol-phosphat nachweisen. Auch LIM und MATELES, 1964 beschrieben eine E. coli-Mutante, die neben 50 mg/l Try noch 350 mg/l Indol ins Medium ausschied. Interessant, aber nicht erklärbar ist bei der Mutante A_1 dieser Arbeit der Befund, daß dieser Stamm nur dann unter den beschriebenen Kulturbedingungen in der Lage ist, etwa 1 g/l Indol zu synthetisieren, wenn man dem Medium Indol zusetzt.

Eine weitere Wechselwirkung zwischen zwei voneinander völlig unabhängigen Aminosäure-Biosynthesewegen wurde bei der Verfütterung von Anthranilsäure festgestellt. Während einige Hefen (z. B. Hansenula anomala) in der Lage sind, die zum Kulturmedium zugegebene Anthranilsäure weitgehend zu Try umzuwandeln (TERUI und NIIZU, 1969) und bei Neurospora crassa durch Anthranilsäure die Indolbildung stimuliert wird (LESTER, 1968), konnten bisher keine Bakterien - auch nicht innerhalb der Gattung der Streptomyceten - mit einer entsprechenden Fähigkeit gefunden werden (TERUI und ENATSU, 1962; GALANINA et al., 1969). So konnten auch die Mutanten von E. coli in dieser Arbeit, die in der Try-Biosynthesekette dereguliert waren, die zugegebene Anthranilsäure nicht zu Try umsetzen, sondern diese bewirkte sogar noch eine Hemmung der Try-Bildung. CORDARO et al., 1968 und ZALKIN und HENDERSON, 1969 fanden, daß in Salmonella typhimurium die Anthranilsäure die Feedback-Hemmung des Try auf die Anthranilat-synthetase und Phosphoribosylanthranilat-transferase wesentlich verstärkt. Außerdem zeigten GIBSON und YANOFSKY, 1960 und LESTER und YANOFSKY, 1961, daß die Anthranilsäure hemmend auf die Indol-3-glycerolphosphat-synthetase wirkt und damit auch auf das Wachstum. Diese bakteriostatische Wirkung der Anthranilsäure kann nach LESTER und YANOFSKY, 1961 völlig durch Try aufgehoben werden, wenn die Anthranilsäure-Konzentration nicht über 500 mg/l liegt. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß L-Isoleucin, L-Leucin, L-Methionin, L-Threonin oder Homoserin die wachstumshemmende Wirkung von 500 mg/l Anthranilsäure antagonisieren. In niederen Konzentrationen scheint die Anthranilsäure somit hemmend auf die Try-Biosynthese zu wirken,

während sie in höheren Konzentrationen in die Aminosäure-Biosynthese der Aspartat-Familie hemmend eingreift. Die Regulation zwischen verschiedenen Biosynthesewegen erfolgt somit wahrscheinlich nur dann, wenn die Kontrollmechanismen der eigenen Synthese nicht mehr funktionieren und folglich viel Anthranilsäure gebildet wird.

Da die Try-Biosynthesekette kein Ausgangs-, Zwischen- oder Endprodukt und auch kein Enzym mit der Biosynthese der Aminosäuren der Aspartat-Familie gemeinsam hat, ist das Eingreifen der Anthranilsäure an dieser Stelle im Stoffwechsel schwer zu verstehen. KARLSTRÖM, 1965 fand jedoch bei E. coli ATCC 4157, daß die wachstumshemmende Wirkung von 5-MT zum Teil durch L-Leucin oder L-Methionin aufgehoben werden kann und daß Norvalin, ein Leucin-Antimetabolit, teilweise durch Try antagonisiert werden kann. Außerdem sprechen noch folgende Fakten für ein spezifisches Eingreifen der Anthranilsäure in den Biosyntheseweg der Aminosäuren der Aspartat-Familie:

1.) Die Mutante IHA_{16}, die gegen 7 mM Anth resistent ist, scheidet relativ viel Valin und Leucin aus.

2.) Die Stämme, die Try überproduzieren und ins Medium abgeben, sind gegen Anthranilsäure nicht resistent.

3.) Zwischen Anthranilsäure und 3-Methylanthranilsäure - die wachstumshemmende Wirkung dieser beider Substanzen wird durch die gleichen Aminosäuren aufgehoben - tritt Kreuzresistenz auf.

4.) Stämme, die gegen Anthranilsäure resistent sind, zeigen dagegen keine Kreuzresistenz mit 5-Methylanthranilsäure.

5.) Da E. coli K 12 eine stereospezifische Permease für die 3 aromatischen Aminosäuren, eine für L-Methionin und eine für L-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin besitzt (PIPERNO und OXENDER, 1968), wird die Anth-Aufnahme sehr wahrscheinlich nicht durch die Aminosäuren der Aspartat-Familie verhindert.

In den letzten Jahren wurden einige Beispiele dafür beschrieben, daß Biosynthese-Endprodukte nicht nur in ihre eigene Biosynthese regulierend eingreifen, sondern auch die Bildung anderer Substanzen beeinflussen können.

1.) In Neurospora crassa und Saccharomyces cerevisiae wird die Chorismatmutase durch Try aktiviert (LINGENS et al., 1967; JENSEN, 1969).

2.) In Bacillus subtilis wird die Prephenatdehydratase durch die Aminosäuren L-Methionin oder L-Leucin aktiviert (JENSEN, 1969).

3.) In Bacillus subtilis führt die Derepression der Try-Biosynthese-Enzyme gleichzeitig zur konstitutiven Bildung der Histidin-Biosynthese-Enzyme (CHAPMAN und NESTER, 1968). Außerdem wirkt L-Histidin aktivierend auf die Anthranilatsynthetase (KANE und JENSEN, 1970).

4.) Die Lysin-sensitive Aspartokinase wird in E. coli kooperativ durch L-Lysin und L-Phenylalanin, L-Lysin und L-Leucin, oder L-Lysin und L-Isoleucin gehemmt (PATTE et al., 1965).

5.) Die Aspartokinase aus Bacillus polymyxa unterliegt einer kumulativen Feedback-Hemmung durch L-Threonin und L-Lysin; die Aminosäuren Ala, Leu, Met, Phe oder Try schützen das Enzym zum Teil vor dieser Enzymhemmung (PAULUS und GRAY, 1968).

6.) In E. coli wird die Phosphoglyceratdehydrogenase durch L-Serin, aber auch durch L-Isoleucin, L-Leucin, L-Methionin oder L-Threonin gehemmt (PIZER und POTOCHNY, 1964).

7.) Auch in Pisum sativum wird die Phosphoglyceratdehydrogenase durch L-Serin gehemmt, während L-Methionin in diesem Fall als Aktivator auf das Enzym wirkt (SLAUGHTER, 1970).

8.) Die wachstumshemmende Wirkung von 2 mM Cystein auf E. coli kann durch L-Isoleucin, L-Leucin, L-Threonin und L-Valin aufgehoben werden (NAGY et al., 1969).

9.) Das Wachstum eines Phenylalanin-auxotrophen Stammes von Aspergillus nidulans wird durch L-Leucin gehemmt, während ein L-Leucin-auxotropher Stamm nicht durch L-Phenylalanin gehemmt werden kann (SINHA, 1970).

10.) Durch Fütterungsversuche konnte gezeigt werden, daß L-Methionin in den Try-Stoffwechsel der Ratte eingreift (SPRINCE et al., 1969).

Wie diese Aufstellung zeigt, ist der Kontrollmechanismus zwischen verschiedenen Biosynthesewegen - "Metabolic Interlock" - (JENSEN, 1969) weit verbreitet. Eine der Hauptaufgaben dieser Regulationsmechanismen besteht wohl darin, die unausgewogene Konzentration eines Biosynthese-Endproduktes oder auch eines Zwischenproduktes (wie z. B. bei der Anthranilsäure) in der Zelle zu korrigieren. Ist z. B. durch eine Mutation die Regulation innerhalb einer Biosynthesekette ausgefallen, so kann mittels der Kontrolle zwischen den Stoffwechselwegen eine Gleichgewichtsstörung im Gesamtstoffwechsel verhindert werden, die zu einer Gefährdung der Lebensfähigkeit des Organismus führen könnte.

Die Regulation einer Biosynthese durch Stoffwechselprodukte anderer Synthesewege kann, wie diese Arbeit zeigt, ganz besonders gut durch Mutanten aufgefunden und untersucht werden, bei denen die bekannten Regulationsmechanismen innerhalb einer Biosynthesekette ausgeschaltet sind. Der Einfluß verschiedener Substanzen auf die Bildung und Ausscheidung des Endproduktes der deregulierten Biosynthese kann dadurch getestet werden, daß man die Stoffe dem Kulturmedium zusetzt und nach einer gewissen Inkubationszeit das produzierte Endprodukt im Kulturfiltrat quantitativ bestimmt. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, auch eine schwache Enzymhemmung oder -repression bzw. Enzymaktivierung oder -induktion in vivo nachzuweisen, die nicht zu einer Beeinflussung des Wachstums führt. So wurde auf diese Weise in dieser Arbeit ermittelt, daß Cystein-auxotrophe Mutanten eine Stoffwechsel-Veränderung erfahren haben, die zur Reduzierung der Try-Ausscheidung führt. Außerdem konnte

mit Hilfe dieser Testmethode nachgewiesen werden, daß Glycin bei Anthranilsäure-Verfütterung die Try- bzw. die Indol-Bildung hemmt. Da bis heute die einzelnen katabolischen und anabolischen Reaktionsketten und deren Regulation in den Organismen weitgehend nur getrennt voneinander untersucht wurden, wäre es mit dieser Testmethode möglich, die Zwischenbeziehungen der verschiedenen Stoffwechselwege in der Zelle aufzuklären. Für das Verständnis des Gesamtstoffwechsels könnte eine Klärung dieser Verflechtungen von großer Bedeutung sein.

Die Gründe für das bisherige Mißlingen einer mikrobiellen Try-Produktion aus Glucose und anorganischem Stickstoff (DULANEY, 1966) - wie das für die Glutaminsäure (BANNUR und PURANDARE, 1969b und das Lysin (BANNUR und PURANDARE, 1969a) seit einigen Jahren möglich ist - sind nach dieser Arbeit:

1.) Für die Try-Biosynthese sind einige Metabolite anderer Stoffwechselwege nötig (Abb. 21), nämlich L-Glutamin, 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat und L-Serin. Da die Synthesewege dieser Substanzen nicht dereguliert sind, werden sie in der Zelle nicht in so großer Menge gebildet, daß eine hohe Try-Bildung erfolgen kann.

2.) Neben dem Endprodukt, L-Tryptophan, wirkt auch noch das Zwischenprodukt, Anthranilsäure, bei entsprechender Konzentration auf die Try-Biosynthese hemmend.

3.) Die Anthranilsäure greift in höherer Konzentration (500 mg/l) außerdem hemmend in die Biosynthese der Aminosäuren der Aspartat-Familie ein.

Es ist somit sehr wichtig, das Zusammenspiel der Biosynthesen und deren Regulation im Gesamtstoffwechsel zu untersuchen, wenn man Stämme "konstruieren" will, die eine bestimmte Substanz in großer Menge produzieren.

V. Zusammenfassung

Mutanten von E. coli K 12, die gegen 1 mM 5-MT resistent sind, scheiden 1,5 - 3 mg/l Try ins Medium aus; sie haben wahrscheinlich eine "Feedback-resistente" Anthranilat-synthetase. Eine zweite Mutation, die zur Resistenz gegen 5-FT führte, bewirkt in diesen Stämmen eine Derepression der Try-Biosynthese-Enzyme. Der Stamm FMT_1, in dem diese beiden Try-Regulationsmechanismen ausgeschaltet sind, produziert 50 mg/l Try.

Es gelang nicht, die Try-Bildung des Stammes FMT_1 dadurch zu steigern, daß auch die Regulationsmechanismen der Phe- und/oder Tyr-Biosynthese, die einen gemeinsamen Grundzweig mit der Try-Synthese haben, weitgehend ausgeschaltet wurden. Phe-und/oder Tyr-auxotrophe Mutanten bilden nicht wesentlich mehr Try als der Ausgangsstamm.

Bei Mutanten von all_1, die eine stark reduzierte Tryptophanase-Aktivität besitzen, kann unter den Bedingungen der katabolischen Repression kein Try-Abbau mehr nachgewiesen werden. Die Try-Ausscheidung beträgt jedoch auch dann nur 55 mg/l. Eine Veränderung der Zellpermeabilität mittels Biotin, Penicillin oder Detergenzien hat keinen wesentlichen Einfluß auf die Try-Produktion.

Die Zugabe von Indol und L-Serin zum Kulturmedium führt zu einer Erhöhung der Try-Bildung beim Stamm Ind_2 bis 700 mg/l. Stämme, die durch den Besitz eines FTry-Episoms heterogenot diploid sind für das Try-Operon, synthetisieren unter günstigen Bedingungen bei Indol- und Serin-Zusatz selbst 1 g/l Indol und bilden maximal 5 g/l Try.

Wird Anthranilsäure zum Kulturmedium zugegeben, so erfolgt eine Abnahme der Try-Ausscheidung um 50 %, weil die Anthranilsäure sehr wahrscheinlich die Aktivität der Indol-3-glycerol-phosphat-synthetase hemmt. Es wurden einige Mutanten

isoliert, die einen Teil der zugesetzten Anthranilsäure bei gleichzeitiger Zugabe von L-Serin zu Try umsetzen können. Außerdem konnte gezeigt werden, daß Anthranilsäure in hoher Konzentration (500 mg/l) hemmend in die Biosynthese der Aminosäuren der Aspartat-Familie eingreift.

VI. Literaturverzeichnis

ADELBERG, E. A.: Selection of bacterial mutants which excrete antagonists of antimetabolites. J. Bacteriol. 76, 326 (1958)

ADELBERG, E. A., M. MANDEL und G. C. CHEN: Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in Escherichia coli K 12. Biochem. biophys. Res. Commun. 18, 788 - 795 (1965)

AMES, G. F.: Uptake of amino acids by Salmonella typhimurium. Arch. Biochem. Biophys. 104, 1 - 18 (1964)

BANDIERA, M., G. MORPURGO und R. RICCI: Tryptophan production by mutant strains of Escherichia coli K 12. Experientia 23, 724 - 725 (1967)

BANNUR, B. B., und G. M. PURANDARE: Microbial production of L-lysine. Hindustan Antibiotics Bulletin 11, 191 - 205 (1969a)

BANNUR, B. B., und G. M. PURANDARE: Microbial production of L-glutamic acid. Hindustan Antibiotics Bulletin 11, 264 - 285 (1969b)

BEGGS, W. H., und H. C. LICHSTEIN: Repression of tryptophanase synthesis in Escherichia coli. J. Bacteriol. 89, 996 - 1004 (1965)

BOEZI, J. A., und R. D. DeMOSS: Properties of a tryptophan transport system in Escherichia coli. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 49, 471 - 484 (1961)

BOTSTEIN, D., und E. W. JONES: Nonrandom mutagenesis of the Escherichia coli genome by nitrosoguanidine. J. Bacteriol. 98, 847 - 848 (1969)

BROCK, T. D., und M. L. BROCK: Reversal of azaserine by phenylalanine. J. Bacteriol. 81, 212 - 217 (1961)

BROWN, K. D., und C. H. DOY: Control of three isoenzymic 7-phospho-2-oxo-3-deoxy-D-arabino-heptonate-D-erythrose-4-phosphate lyases of Escherichia coli W and derived mutants by repressive and "inductive" effects of the aromatic amino acids. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 118, 157 - 172 (1966)

BROWN, K. D.: Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in Escherichia coli K 12. Genetics 60, 31 - 48 (1968)

BROWNE, D. T., G. L. KENYON und G. D. HEGEMAN: Incorporation of monofluorotryptophan into protein during the growth of Escherichia coli. Biochem. biophys. Res. Commun. 39, 13 - 19 (1970)

CALVO, R. A., und J. M. CALVO: Lack of end-product inhibition and repression of leucine synthesis in a strain of Salmonella typhimurium. Science 156, 1107 - 1109 (1967)

CHANGEUX, J. P.: Allosteric interactions on biosynthetic L-threonine deaminase from E. coli K 12. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 28, 497 - 504 (1963)

CHAPMAN, L. F., und E. W. NESTER: Common element in the repression control of enzymes of histidine and aromatic amino acid biosynthesis in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 96, 1658 - 1663 (1968)

CIFERRI, O., S. SORA und O. TIBONI: Effect of gene dosage on tryptophan synthetase activity in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 61, 567 - 576 (1969)

COHEN, G., und F. JACOB: Sur la répression de la synthèse des enzymes intervenant dans la formation du tryptophane chez Escherichia coli. Compt. Rend. 248, 3490 - 3492 (1959)

COHEN, G. N.: Regulation of enzyme activity in microorganisms. Ann. Rev. Microbiol.19, 105 - 126 (1965)

CORDARO, J. C., H. R. LEVY und E. BALBINDER: Product inhibition of anthranilate synthetase in Salmonella typhimurium. Biochem. biophys. Res. Commun. 33, 183 - 189 (1968)

DeCROMBRUGGHE, B., R. L. PERLMAN, H. E. VARMUS und I. PASTAN: Regulation of inducible enzyme synthesis in Escherichia coli by cyclic adenosine 3,5-monophosphate. J. biol. Chem. 244, 5828 - 5835 (1969)

DAVIS, B. D.: Isolation of biochemically deficient mutants of bacteria by penicillin. J. Amer. chem. Soc. 70, 4267 (1948)

DAVIS, B. D.: Studies on nutritionally deficient bacterial mutants isolated by means of penicillin. Experientia 6, 41 - 50 (1950)

DAVIS, B. D., und E. S. MINGIOLI: Mutants of Escherichia coli requiring methionine or vitamin B_{12}. J. Bacteriol. 60, 17 - 28 (1950)

DEMAIN, A. L.: Industrial fermentation and their relation to regulatory mechanisms. Adv. appl. Microbiol. 8, 1 - 27 (1966)

DEMAIN, A. L., und J. BIRNBAUM: Alteration of permeability for the release of metabolites from microbial cell. Current Top. Microbiol. Immunol. 46, 1 - 25 (1968)

DOOLITTLE, W. F., und C. YANOFSKY: Mutants of Escherichia coli with an altered tryptophanyl-transfer ribonucleic acid synthetase. J. Bacteriol. 95, 1283 - 1294 (1968)

DOY, C. H.: Control of aromatic biosynthesis particularly with regard to the common pathway and the allosteric enzyme, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthetase. Rev. pure appl. Chem. 18, 41 - 78 (1968)

DULANEY, E. L.: Microbial production of amino acids. Dev. industr. Microbiol. 7, 47 - 58 (1966)

DUDA, E., M. STAUB, P. VENETIANER und G. DÉNES: Interaction between phenylalanine-t-RNA and the allosteric first enzyme of the aromatic amino acid biosynthetic pathway. Biochem. biophys. Res. Commun. 32, 992 -997 (1968)

EIDLIC, L., und F. C. NEIDHARDT: Role of valyl-sRNA synthetase in enzyme repression. Proc. nat. Acad. Sci (Wash.) 53, 539 - 543 (1965)

EZEKIEL, D. H.: False feddback inhibition of aromatic amino acid biosynthesis by ß-2-thienylalanine. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 95, 54 - 62 (1965)

McFALL, E., und J. MANDELSTAM: Specific metabolic repression of induced enzymes in Escherichia coli. Nature (Lond.) 197, 880 - 881 (1963)

FOWDEN, L., D. LEWIS und H. TRISTRAM: Toxic amino acids: their action as antimetabolites. Adv. Enzymology 29, 89 - 163 (1967)

FREDERICQ, P.: The recombination of colicinogenic factors with other episomes and plasmids. In: "Bacterial episomes and plasmids", A Ciba foundation Symposium, 163 - 178; Hrg.: G. E. W. Wolstenholme und M. O'Connor, London (1969)

FREUNDLICH, M., und H. C. LICHSTEIN: Inhibitory effect of glucose on tryptophanase. J. Bacteriol. 80, 633 - 638 (1960)

FREUNDLICH, M., und H. C. LICHSTEIN: Tryptophanase - tryptophan synthetase systems in Escherichia coli. I. Effect of tryptophan and related compounds. J. Bacteriol. 84, 979 - 987 (1962)

GALANINA, L. A., I. M. NIZOVA und P. A. AGATOV: The biosynthesis of tryptophan by Actinomycetes. Microbiol. (Moscow) 38, 49 - 52 (1969)

GARTNER, T. K., und M. RILEY: Isolation of mutants affecting tryptophanase production in Escherichia coli. J. Bacteriol. 89, 313 - 318 (1965)

GAVIN, J. J., und W. W. UMBREIT: Effect of biotin on fatty acid distribution in Escherichia coli. J. Bacteriol. 89, 437 - 443 (1965)

GIBSON, F., und C. YANOFSKY: The partial purification and properties of indole-3-glycerol phosphate synthetase from Escherichia coli. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 43, 489 - 500 (1960)

GIBSON, F., und J. PITTARD: Pathways of biosynthesis of aromatic amino acids and vitamins and their control in microorganisms. Bacteriol. Reviews 32, 465 - 492 (1968)

GOLLUB, E., und D. B. SPRINSON: A regulatory mutation in tyrosine biosynthesis. Biochem. biophys. Res. Commun. 35, 389 - 395 (1969)

GUNSALUS, I. C., C. C. GALEENER und J. R. STAMER: Tryptophan cleavage, tryptophanase from E. coli. In: "Methods in Enzymology" 2, 238 - 242; Hrg.: S. P. Colowick und N. O. Kaplan, Academic Press, New York (1955)

HAYES, W.: "The genetics of bacteria and their viruses". Blackwell scientific publications, Oxford und Edinburgh (1968)

HELD, W. A., und O. H. SMITH: Mechanisms of 3-methylanthranilic acid derepression of the tryptophan operon in Escherichia coli. J. Bacteriol. 101, 209 - 217 (1970)

HERSCHMAN, H. R., und D. R. HELINSKI: Comparative study of the events associated with colicin induction. J. Bacteriol. 94, 691 - 699 (1967)

HILL, F., und H. G. SCHLEGEL: Regulationsdefekte bei trifluorleucinresistenten Mutanten von Hydrogenomonas H 16. Arch. Mikrobiol. 68, 18 - 31 (1969)

HIRAGA, S., K. ITO, T. MATSUYAMA, H. OZAKI und T. YURA: 5-Methyltryptophan-resistant mutations linked with the arginine G marker in Escherichia coli. J. Bacteriol. 96, 1880 - 1881 (1968)

HIRAGA, S.: Operator mutants of the tryptophan operon in Escherichia coli. J. molec. Biol. 39, 159 - 179 (1969)

HISHINUMA, F., K. IZAKI und H. TAKAHASHI: Effects of glycine and D-amino acids on growth of various microorganisms. Agr. biol. Chem. 33, 1577 - 1586 (1969)

HOCH, J. A., und R. D. DeMOSS: Physiological role of tryptophanase in control of tryptophan biosynthesis in Bacillus alvei. J. Bacteriol. 91, 667 - 672 (1966)

IMAMOTO, F.: On the initiation of transcription of the tryptophan operon in Escherichia coli. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 60, 305 - 312 (1968)

ITO, J., und I. P. CRAWFORD: Regulation of the enzymes of the tryptophan pathway in Escherichia coli. Genetics 52, 1303 - 1316 (1965)

ITO, J., und C. YANOFSKY: The nature of the anthranilic acid synthetase complex of Escherichia coli. J. biol. Chem. 241, 4112 - 4114 (1966)

ITO, J., und F. IMAMOTO: Sequential derepression and repression of the tryptophan operon in Escherichia coli. Nature (Lond.) 220, 441 - 444 (1968)

ITO, J., und C. YANOFSKY: Anthranilate synthetase, an enzyme specified by the tryptophan operon of Escherichia coli: Comparative studies on the complex and the subunits. J. Bacteriol. 97, 734 - 742 (1969)

ITO, J., E. COX und C. YANOFSKY: Anthranilate synthetase, an enzyme specified by the tryptophan operon of Escherichia coli: Purification and characterization of component I. J. Bacteriol. 97, 725 - 733 (1969)

ITO, K., S. HIRAGA und T. YURA: Tryptophanyl transfer RNA synthetase and expression of the tryptophan operon in trp S mutants of Escherichia coli. Genetics 61, 521 - 538 (1969a)

ITO, K., S. HIRAGA und T. YURA: Temperature-sensitive repression of the tryptophan operon in Escherichia coli. J. Bacteriol. 99, 279 - 286 (1969b)

JENSEN, R. A.: Metabolic interlock. Regulatory interactions exerted between biochemical pathways. J. biol. Chem. 244, 2816 - 2823 (1969)

JENSEN, R. A., D. S. NASSER und E. W. NESTER: Comparative control of a branch-point enzyme in microorganisms. J. Bacteriol. 94, 1582 - 1593 (1967)

KANE, J. F., und R. A. JENSEN: Metabolic interlock. Influence of histidine on tryptophan biosynthesis in Bacillus subtilis. J. biol. Chem. 245, 2384 - 2390 (1970)

KANO, Y., A. MATSUSHIRO und Y. SHIMURA: Isolation of the novel regulatory mutants of the tryptophan biosynthetic system in Escherichia coli. Molec. gen. Genetics 102, 15 - 26 (1968)

KARLSTRÖM, O.: Methods for the production of mutants suitable as amino acid fermentation organisms. Biotech. Bioeng. 7, 245 - 268 (1965)

LEDERBERG, J., und E. M. LEDERBERG: Replica plating and indirect selection of bacteria mutants. J. Bacteriol. 63, 399 - 402 (1952)

LENNOX, E. S.: Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P_1. Virology 1, 190 - 206 (1955)

LESTER, G.: In vivo regulation of intermediate reactions in the pathway of tryptophan biosynthesis in Neurospora crassa. J. Bacteriol. 96, 1768 - 1773 (1968)

LESTER, G., und C. YANOFSKY: Influence of 3-methylanthranilic and anthranilic acid on the formation of tryptophan synthetase in Escherichia coli. J. Bacteriol. 81, 81 - 90 (1961)

LIM, P. G., und R. I. MATELES: Tryptophan- and indole-excreting prototrophic mutant of Escherichia coli. J. Bacteriol. 87, 1051 - 1055 (1964)

LINGENS, F., und O. OLTMANNS: Erzeugung und Untersuchung biochemischer Mangelmutanten von Saccharomyces cerevisiae. Z. Naturforschg. 19b, 1058 - 1065 (1964)

LINGENS, F., W. GOEBEL und U. UESSELER: Regulation der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren in Saccharomyces cerevisiae. European J. Biochem. 1, 363 - 374 (1967)

LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

MORSE, D. E., und C. YANOFSKY: The internal low-promoter of the tryptophan operon of Escherichia coli. J. molec. Biol. 38, 447 - 451 (1968)

MORSE, D. E., und C. YANOFSKY: A transcription-initiating mutation within a structural gene of the tryptophan operon. J. molec. Biol. 41, 317 - 328 (1969a)

MORSE, D. E., und C. YANOFSKY: Amber mutants of the trp R regulatory gene. J. molec. Biol. 44, 185 - 193 (1969b)

MOYED, H. S.: False feedback inhibition: Inhibition of tryptophan biosynthesis by 5-methyltryptophan. J. biol. Chem. 235, 1098 - 1102 (1960)

MÜLLER, A.: Siderochrome aus Mikroorganismen. Dissertation Universität Tübingen (1968)

NAGY, Z., C. KARI und F. HERNADI: Growth of Escherichia coli cells in the presence of cysteine on sulfate-deficient media. Arch. Mikrobiol. 65, 391 - 400 (1969)

NAKAYAMA, K., S. KITADA und S. KINOSHITA: Studies on lysine-fermentation.I. The control mechanism on lysine accumulation by homoserine and threonine. J. gen. appl. Microbiol. 7, 145 - 154 (1961)

NASS, G., K. PORALLA und H. ZÄHNER: Effect of the antibiotic borrelidin on the regulation of threonine biosynthetic enzymes in E. coli. Biochem. biophys. Res. Commun. 34, 84 - 91 (1969)

NESTER, E. W.: Cross pathway regulation: Effect of histidine on the synthesis and activity of enzymes of aromatic acid biosynthesis in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 96, 1649 - 1657 (1968)

NÜESCH, J.: Physiologische und biochemische Aspekte industrieller Fermentationsprozesse. Path. et Microbiol. (Basel) 34, 158 - 194 (1969)

PASTAN, I., und R. L. PERLMAN: Stimulation of tryptophanase synthesis in Escherichia coli by cyclic 3,5-adenosine monophosphate. J. biol. Chem. 244, 2226 - 2232 (1969)

PATTE, J. D., T. LOVING und G. N. COHEN: Effects inhibiteurs cooperatifs de la L-lysine avec d'autres amino acides sur une aspartokinase de Escherichia coli. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 99, 523 - 53o (1965)

PAULUS, H., und E. GRAY: Multivalent feedback inhibition of aspartokinase in Bacillus polymyxa. II. Effect of nonpolar L-amino acids. J. biol. Chem. 243, 1349 - 1355 (1968)

PIPERNO, J. R., und D. L. OXENDER: Amino acid transport systems in Escherichia coli K 12. J. biol. Chem. 243, 5914 - 5920 (1968)

PITTARD, J., J. CAMAKARIS und B. J. WALLACE: Inhibition of 3-deoxy-D-arabinoheptulosonic acid-7-phosphate synthetase (trp) in Escherichia coli. J. Bacteriol. 97, 1242 - 1247 (1969)

PIZER, L. I., und M. L. POTOCHNY: Nutritional and regulatory aspects of serine metabolism in Escherichia coli. J. Bacteriol. 88, 611 - 619 (1964)

PORALLA, K.: Zur Wirkungsweise des makrolidartigen Antibiotikums Borrelidin und typischer Makrolid-Antibiotika. Dissertation Universität Tübingen (1967)

PREVIC, E., und S. BINKLEY: Repression and inhibition of 3-deoxy-D-arabinoheptulosonic acid-7-phosphate synthetase by parafluorophenylalanine in Escherichia coli. Biochem. biophys. Res. Commun. 16, 162 - 166 (1964)

RAVEL, J. M., M. N. WHITE und W. SHIVE: Activation of tyrosine analogs in relation to enzyme repression. Biochem. biophys. Res. Commun. 20, 352 - 359 (1965)

ROTH, J. R., und B. N. AMES: Histidine regulatory mutants in Salmonella typhimurium. II. Histidine regulatory mutants having altered histidyl-t-RNA synthetase. J. molec. Biol. 22, 325 - 334 (1966)

SATO, T., K. AIDA und T. UEMURA: Contribution of glyolysis to catabolite repression of L-tryptophanase syntheses in Escherichia coli. J. gen. appl. Microbiol. 15, 109 - 121 (1969)

SCHLEGEL, H. G., und H. W. JANNASCH: Enrichment cultures. Ann. Rev. Microbiol. 21, 49 - 70 (1967)

SCHLEGEL, H. G.: "Allgemeine Mikrobiologie", G. Thieme, Stuttgart (1969)

SCHERR, H. G., und M. E. RAFELSON jr.: The directed isolation of mutants producing increased amounts of metabolites. J. appl. Bacteriol. 25, 187 - 194 (1962)

SHIIO, I., und S. NAKAMORI: Microbial production of L-threonine part I. Production by Escherichia coli mutant resistant to α-amino-ß-hydroxyvaleric acid. Agr. biol. Chem. 33, 1152 - 1160 (1969)

SHIVE, W., und C. G. SKINNER: Amino acid analogues. In: "Metabolic Inhibitors" 2 - 73; Hrg.: R. M. Hochster und J. H. Quastel; Academic Press, New York und London (1963)

SHOCKMAN, G. D.: Amino acids. In: "Analytical Microbiology" 567 - 673; Hrg.: F. Kavanagh; Academic Press, New York und London (1963)

SINHA, U.: Competition between leucine and phenylalanine and its relation to p-fluorophenylalanine resistant mutations in Aspergillus nidulans. Arch. Mikrobiol. 72, 308 -317 (1970)

SLAUGHTER, J. C.: The activation of 3-phosphoglycerate dehydrogenase by L-methionine. FEBS Letters 7, 245 - 247 (1970)

SMITH, O. H., und C. YANOFSKY: Enzymes involved in the biosynthesis of tryptophan. In: "Methods in Enzymology" 5, 794 - 806; Hrg.: S. P. Colowick und N. O. Kaplan; Academic Press, New-York (1962)

SMITH, L. C., J. M. RAVEL, S. R. LAX und W. SHIVE: The effects of phenylalanine and tyrosine analogs on the synthesis and activity of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthetases. Arch. Biochem. Biophys. 105, 424 - 430 (1964)

SOMERVILLE, R. L., und C. YANOFSKY: Studies on the regulation of tryptophan biosynthesis in Escherichia coli. J. molec. Biol. 11, 747 - 759 (1965)

SPRINCE, H., C. M. PARKER, D. JAMESON und J. A. JOSEPHS: Experimental alteration of tryptophan metabolism by methionine: Neuropharmacologic implications. Neuropharmacol. 8, 615 - 626 (1969)

TAKINAMI, T., H. OKADA und T. TSUNODA: Biochemical effects of fatty acid and its derivatives on L-glutamic acid fermentation. 2. Effective chemical structure of fatty acid derivatives on the accumulation of L-glutamic acid in biotin sufficient medium. Agr. biol. Chem. 28, 114 - 119 (1964)

TAMIR, H., und P. R. SRINIVASON: Purification and properties of anthranilate synthetase from Salmonella typhimurium. J. biol. Chem. 244, 6507 - 6513 (1969)

TAYLOR, A. L.: Current linkage map of Escherichia coli. Bacteriol. Reviews 34, 155 - 175 (1970)

TERUI, G., und T. ENATSU: On the fermentative production of tryptophan from anthranilic acid by yeast. Technol. Rept. Osaka Uni. 12, 477 - 493 (1962)

TERUI, G., und H. NIIZU: Recent studies on the fermentative production of L-tryptophan. Biotech. Bioeng. Symposium 1, 33 - 52 (1969)

TIPPER, D. J., und J. L. STROMINGER: Mechanism of action of penicillin: A proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 54, 1133 - 1141 (1965)

UDAKA, S., und S. KINOSHITA: Studies on L-ornithine fermentation. II. The change of fermentation product by a feedback type mechanism. J. gen. appl. Microbiol. 4, 283 - 288 (1958)

ULLMANN, A., und J. MONOD: Cyclic AMP as an antagonist of catabolite repression in Escherichia coli. FEBS Letters 2, 57 - 60 (1968)

VOLCANI, B. E., S. SICHER, E. D. BERGMANN und H. BENDAS: Action of some substituted anthranilic acids on Escherichia coli. J. biol. Chem. 207, 411 - 420 (1954)

WILLETTS, N. S.: The elimination of $Flac^{+}$ from Escherichia coli by mutagenic agents. Biochem. biophys. Res. Commun. 27, 112 - 117 (1967)

YANOFSKY, C.: The tryptophan synthetase system. Bacteriol. Reviews 24, 221 - 245 (1960)

YURA, T., M. IMAI, T. OKAMOTO und S. HIRAGA: Transcription of the tryptophan operon of Escherichia coli in vitro. I. Detection and quantitative determination of specific RNA. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 169, 494 - 510 (1968)

ZÄHNER, H., R. HÜTTER und E. BACHMANN: Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. 23. Mitteilung. Zur Kenntnis der Sideromycinwirkung. Arch. Mikrobiol. 36, 325 - 349 (1960)

ZÄHNER, H.: "Biologie der Antibiotika", Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York (1965)

ZALKIN, H.: Control of aromatic amino acid biosynthesis in Salmonella typhimurium. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 148, 609 - 621 (1967)

ZALKIN, H., und E. J. HENDERSON: Tryptophan-mediated substrate inhibition of anthranilate-5-phosphoribosyl-pyrophosphate phospho-ribosyltransferase. Biochem. biophys. Res. Commun. 35, 52 - 58 (1969)

ZINDER, N. D.: RNA phages. Ann. Rev. Microbiol. 19, 455 - 472 (1965)

L e b e n s l a u f

Am 5.9.1942 wurde ich als Sohn des Landwirts Christian Sahm und seiner Ehefrau Anna, geb. Wolf, in Künzelsau geboren.

Von 1949 bis 1954 besuchte ich die Volksschule in Haag, Kr. Öhringen, und von 1954 bis 1963 das Math.-Nat. und Neuspr. Gymnasium in Künzelsau, wo ich 1963 das Abitur ablegte.

Im Sommersemester 1963 begann ich an der Universität Göttingen das Studium der Biologie und Chemie. Nach 6 Semestern wechselte ich an die Universität Tübingen über (SS 1966), wo ich im Frühjahr 1968 die Diplomhauptprüfung in Biologie ablegte. Am Institut für Biologie, Lehrbereich Mikrobiologie, der Universität Tübingen begann ich im Sommersemester 1968 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner mit der Durchführung der vorliegenden Dissertation: "Untersuchungen zur Tryptophan-Bildung bei Escherichia coli K 12".

Meine akademischen Lehrer waren:

In Göttingen: P. Ax, L. Bergmann, G. Birukow, R. Bornkamm, H. Brockmann, A. Flammersfeld, O. Glemser, G. Heberer, R. Hilsch, W. Jost, H. Lorenzen, R. Meyer, A. Pirson, G. Röbbelen, H. G. Schlegel und A. Trebst.

In Tübingen: A. Anderer, W. Beermann, E. Buddecke, E. Bünning, D. Dütting, U. Feine, H. Friedrich-Freksa, A. Gierer, U. Henning, E. Kallee, F. Lingens, W. Loeffler, H. Metzner, G. Schramm, B. Schwemmle, W. Seyffert, W. Vielmetter, G. Weitzel, H. G. Wittmann und H. Zähner.